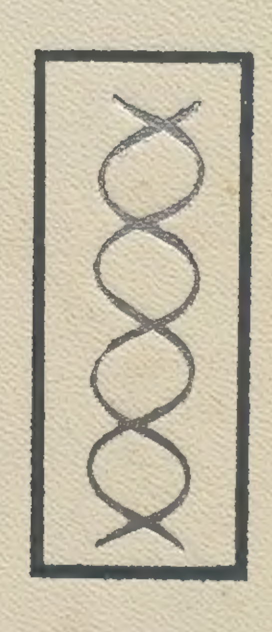
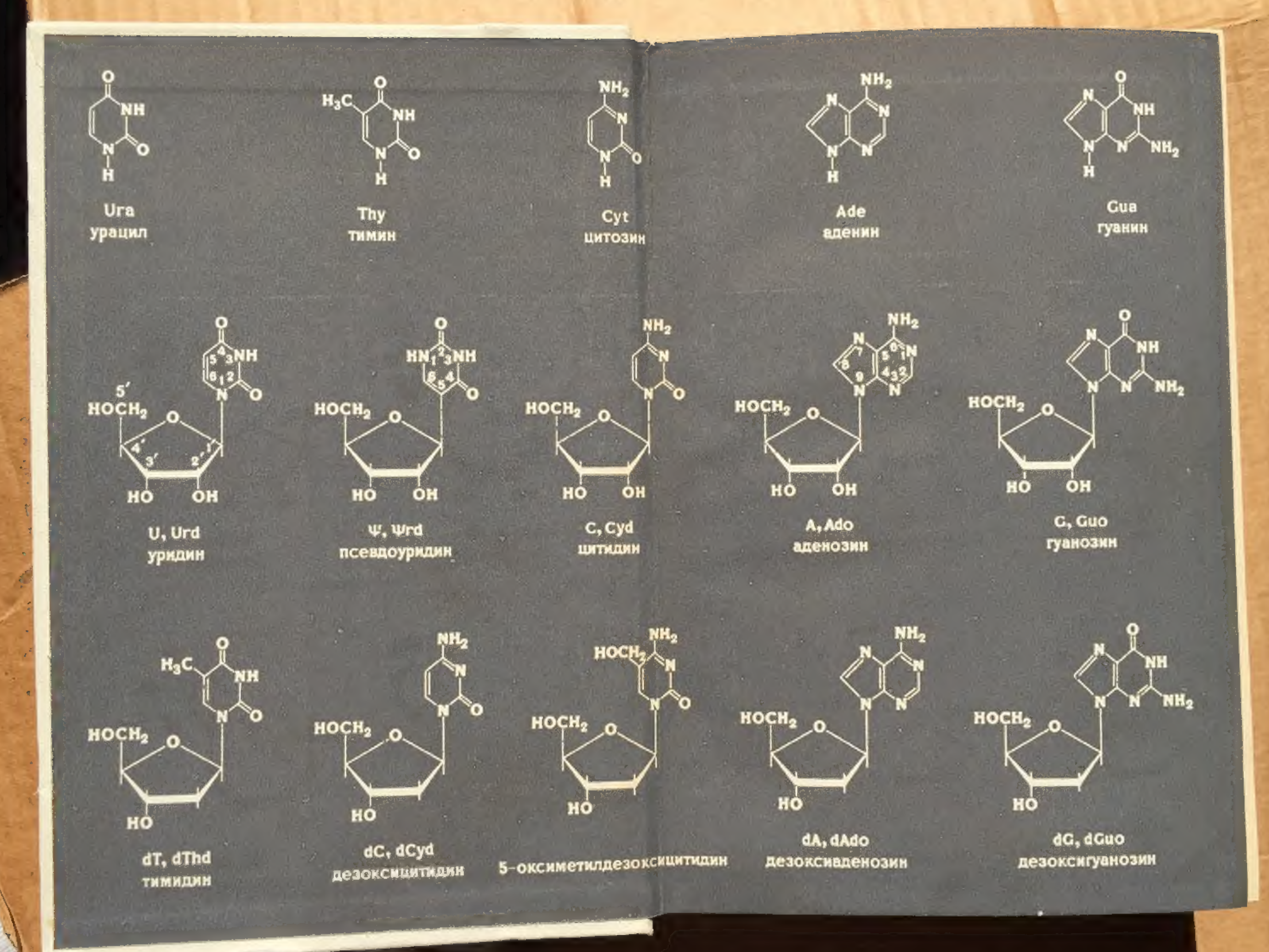
ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ




Ura
урацил
Thy
тимин
Cyt
цитозин
Ade
аденин
Gua
гуанин
U, Urd
уридин
Ψ, Ψrd
псевдоуридин
C, Cyd
цитидин
A, Ado
аденозин
G, Guo
гуанозин
dT, dThd
тимидин
dC, dCyd
дезоксицитидин
5-оксиметилдезоксицитидин
dA, dAdo
дезоксиаденозин
dG, dGuo
дезоксигуанозин

Ura
урацил

Thy
тимин

Cyt
цитозин

U, Urd
уридин

Ψ, Ψrd
псевдоуридин

C, Cyd
цитидин

dT, dThd
тимидин

dC, dCyd
дезоксицитидин

5-оксиметилдезоксицитидин

Cyt
цитозин

Ade
аденин

Gua
гуанин

C, Cyd
цитидин

A, Ado
аденозин

G, Guo
гуанозин

dA, dAdo
дезоксиаденозин

dG, dGuo
дезоксигуанозин

иметилдезоксицитидин

.К.КОЧЕТКОВ, Э
Н.А.СИМУКОВА, М

ОРГА
ХИМ
НУКЛ

ПОД РЕДАК
Н.К.КОЧЕТК

ИЗДАТЕЛЬСТВО «ХИ

Н. К. КОЧЕТКОВ, Э. И. БУДОВСКИЙ, Е. Д. СВЕРДЛОВ,
Н. А. СИМУКОВА, М. Ф. ТУРЧИНСКИЙ, В. Н. ШИБАЕВ

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ПОД РЕДАКЦИЕЙ
Н. К. КОЧЕТКОВА и Э. И. БУДОВСКОГО



ИЗДАТЕЛЬСТВО «ХИМИЯ» МОСКВА 1970

УДК 547.963.32:577.155.2
К 55

Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов, Н. А. Симукова, М. Ф. Турчинский, В. Н. Шибаев, **Органическая химия нуклеиновых кислот.**

В книге систематизированы данные по органической химии нуклеиновых кислот и их компонентов — гетероциклических оснований, углеводных остатков и фосфатных групп. Основное внимание уделено строению, физико-химическим свойствам и реакционной способности компонентов нуклеиновых кислот. Рассмотрены основные реакции, используемые при изучении структуры и функций нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов и нуклеотидкоферментов.

Книга предназначена для научных работников, преподавателей, студентов и аспирантов, занимающихся вопросами биоорганической химии, молекулярной биологии и генетики.

В книге 720 стр., 108 табл., 78 рис., 2733 библ. ссылки.

2-5-4
23-70

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ

Изучение нуклеиновых кислот является одной из точек наиболее бурного развития современного естествознания. Исключительный интерес, который приобрели нуклеиновые кислоты для познания сущности процесса жизнедеятельности, находит отражение в посвященной им огромной литературе, в том числе в целом ряде превосходных монографий и обзоров. Наиболее подробно рассмотрены в литературе вопросы, касающиеся путей биосинтеза и метаболизма нуклеиновых кислот и разнообразных биологических функций этих биополимеров. Почти столь же большое внимание уделяется вопросам макромолекулярной химии нуклеиновых кислот — выяснению размера и формы их молекулы, изучению физико-химических свойств их растворов и соответствующим методическим вопросам.

Химическая обзорная литература по нуклеиновым кислотам посвящена почти исключительно синтезу, в особенности синтетической химии мономеров (нуклеозидов и нуклеотидов), и в меньшей степени синтезу полинуклеотидов. Между тем имеется еще один важнейший аспект химии нуклеиновых кислот, который находится пока еще в процессе становления. Речь идет об изучении реакционной способности макромолекул нуклеиновых кислот и их компонентов, что важно как для выяснения вопросов, касающихся строения этих важнейших биополимеров, так и для правильного понимания их биологических функций. В последние годы подобные исследования начали очень быстро расширяться. Однако до сих пор данная сторона химии нуклеиновых кислот, по существу, не нашла должного отражения в обзорной литературе, за исключением нескольких обзоров по более или менее частным вопросам.

Авторы настоящей монографии делают попытку восполнить этот пробел, отдавая себе отчет в трудности поставленной задачи. Книга посвящена реакциям нуклеиновых кислот и их компонентов; эти реакции приводят к изменениям структуры, к так называемой химической модификации нуклеиновых кислот.

Хотя конечной целью книги является ознакомление читателя с химическими реакциями полинуклеотидов, основная часть ма-

териала касается все же химических превращений мономерных компонентов нуклеиновых кислот — нуклеозидов и нуклеотидов. Это связано прежде всего с тем, что правильное понимание вопросов реакционной способности полимеров немыслимо без знания реакций мономерных звеньев. Вместе с тем основная масса исследований проведена в настоящее время еще именно на мономерном уровне, и лишь немногие достаточно серьезные работы посвящены химической модификации самих биополимеров. Тем не менее уже данные о реакциях мономеров, особенно в тех случаях, когда имело место глубокое и детальное изучение вопроса, представляют большой интерес для правильного понимания и решения проблем структуры нуклеиновых кислот и в еще большей степени для целесообразного использования соответствующих реакций при изучении биологической функции нуклеиновых кислот.

В настоящей книге использована литература по конец 1968 г., а также отдельные работы, опубликованные позже. Весь материал монографии делится на две части. Первая часть книги (гл. 1—4) посвящена общим вопросам органической химии нуклеиновых кислот. В ней рассматриваются вопросы конформации и электронной структуры мономеров, реакционной способности гетероциклических оснований (в том числе квантовохимический аспект проблемы), а также важный вопрос о нековалентных взаимодействиях в полимерной цепи нуклеиновых кислот. Мы сочли целесообразным начать первую часть книги с краткого обзора, посвященного классификации, распространению нуклеиновых кислот и принципам установления их первичной структуры.

Вторая часть книги (гл. 5—12) посвящена, так сказать, частной органической химии нуклеиновых кислот. Здесь рассматриваются отдельные типы реакций гетероциклических ядер, реакции углеводного остатка и фосфатной группы. Отдельная глава посвящена краткому изложению фотохимии нуклеиновых кислот.

Приводится рекомендуемый список символов и сокращений полинуклеотидов, их компонентов и производных.

В книге не излагаются специально вопросы синтетической химии нуклеиновых кислот и их мономерных компонентов. Наличие ряда монографий по этому разделу и желание ограничить объем книги делают нецелесообразным рассмотрение обширной литературы по методам синтеза нуклеозидов и нуклеотидов; крайне сжато рассмотрены лишь вопросы синтеза полинуклеотидов. Тем не менее многие разделы книги тесно соприкасаются с вопросами синтеза и могут быть, по нашему мнению, полезны химику-синтетику, который найдет здесь материал о реакционной способности функциональных групп, входящих в состав нуклеозидов и нуклеотидов, а также описание отдельных реакций, весьма полезных для синтетических целей.

Авторы отлично сознают слабые стороны написанной работы — условность и отчасти искусственность разбивки материала, возможную ошибочность некоторых приводимых ими собственных точек зрения и ряд других недостатков. Оправданием настоящей попытки может послужить отчасти то, что, как уже указывалось, органохимический аспект химии нуклеиновых кислот лишь в самое последнее время привлек пристальное внимание и это направление находится сейчас в стадии становления. Вместе с тем именно данное обстоятельство и дает авторам право надеяться, что обобщение имеющихся в настоящее время данных особенно полезно. Мы будем считать свою задачу выполненной, если издание этой книги будет способствовать дальнейшему развитию исследований по органической химии нуклеиновых кислот.

Авторы выражают глубокую благодарность за помощь при создании этой книги чл.-корр. АН СССР Д. Г. Кнорре, чл.-корр. АН СССР М. А. Прокофьеву, проф. З. А. Шабаровой, проф. Ю. С. Лазуркину, канд. хим. наук М. А. Кузьмину, канд. физ.-мат. наук Э. Н. Трифонову, канд. физ.-мат. наук М. Д. Франк-Каменецкому и канд. физ.-мат. наук В. И. Данилову.

Авторы

Москва, май 1969 г.

ВВЕДЕНИЕ

Комплекс наук, связанный с познанием существа жизненных процессов, занимает в современном естествознании особое место. Развитию этого направления отдали свой талант и свой труд многие крупнейшие ученые нашего времени; уровень знаний здесь растет с необычайной стремительностью. Желание понять самую суть дела, наиболее интимные стороны процесса жизнедеятельности привели исследователей к необходимости проникнуть в самые глубины биологического процесса, доводя понимание его до молекулярного уровня, когда внешние физиологические проявления могут быть объяснены в конечном счете химическим превращением или физическим изменением отдельной молекулы. Становление этой генеральной концепции молекулярной биологии в огромной степени стимулировало интерес к изучению химических веществ, превращения и изменения которых и лежат в основе процесса жизнедеятельности. К ним относятся прежде всего природные высокомолекулярные соединения — белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, а также смешанные биополимеры.

Нуклеиновые кислоты занимают исключительное место в процессе жизнедеятельности, они, по сути дела, лежат у самого его истока. Они являются той материальной субстанцией, которая несет в себе генетическую информацию — основу всего развития будущего организма. С другой стороны, нуклеиновые кислоты являются инструментом, с помощью которого осуществляется синтез специфических белков. Сказанного достаточно для того, чтобы полностью осознать ту особую роль, какую занимает в современном естествознании наука о нуклеиновых кислотах, и оправдать то необычайное внимание, которое уделяют исследованию этой науки сотни лабораторий в разных странах.

В 1869 г. Мишер выделил из ядер клеток вещество, обладающее кислотными свойствами, и назвал его нуклеиновой кислотой. За истекшее столетие в исследованиях нуклеиновых кислот можно выделить следующие этапы.

1. Предварительные исследования. Этот этап охватывает историческую работу Мишера, выделившего нуклеиновую кислоту и

показавшего, что в ее состав входят углерод, водород, кислород, азот и фосфор, а также исследования Косселя, установившего наличие двух типов нуклеиновых кислот в клетках, и, наконец, работы Э. Фишера по изучению пуринов и пиримидинов, являющихся компонентами нуклеиновых кислот.

2. Второй этап — с начала нашего века по тридцатые годы. Здесь проводилось изучение главным образом продуктов расщепления нуклеиновых кислот. В ходе исследований были выделены и изучены мономерные компоненты нуклеиновых кислот. Левин и отчасти Гулланд установили структуру углеводных остатков, нуклеозидов и нуклеотидов. На основании полученных данных Левин выдвинул так называемую тетрануклеотидную гипотезу строения нуклеиновых кислот, не подтвердившуюся впоследствии. Отсутствие подходящих методов выделения, физико-химической и биологической характеризации нуклеиновых кислот и данных об их роли в процессах жизнедеятельности сдерживало развитие исследований в этой области.

3. В начале сороковых годов нашего столетия были получены косвенные, а затем и прямые доказательства участия нуклеиновых кислот в передаче генетической информации (Эвери, Маклеод и Маккарти). Это послужило мощным стимулом развития органической химии нуклеиновых кислот. В результате работ, проведенных главным образом кембриджской школой под руководством Тодда, было полностью доказано строение нуклеозидов и нуклеотидов, разработаны методы их синтеза и установлены основные принципы строения нуклеиновых кислот как высокомолекулярных соединений. Эти данные, а также результаты изучения нуклеотидного состава, полученные Чаргаффом, легли в основу гипотезы Уотсона и Крика (1953 г.) — одного из краеугольных камней современной молекулярной биологии.

4. Последующий этап ознаменован бурным развитием исследований нуклеиновых кислот, в ходе которых тесно переплетались и взаимно обогащали друг друга результаты, полученные биологами, физиками и химиками. В этот период изучены биосинтез нуклеиновых кислот (Корнберг, Очоа), механизм передачи и реализации генетической информации (Крик, Жакоб, Моно, Ниренберг). Большое внимание уделялось физической и синтетической химии нуклеиновых кислот (Доти, Корана). В исследованиях широко использовались природные и синтетические олиго- и полинуклеотиды, что позволило выяснить ряд структурных и функциональных особенностей нуклеиновых кислот, однозначно установить код белкового синтеза.

5. Наконец, на современном этапе, начало которого можно датировать 1965 г., помимо развития биологических и физических методов изучения нуклеиновых кислот все большее внимание привлекают химические подходы. Этот период отмечен разработкой

методов установления первичной структуры низкомолекулярных рибонуклеиновых кислот (Холли, Сангер), синтезом достаточно крупных дезоксиполинуклеотидных матриц (Корана), широким изучением органической химии нуклеиновых кислот и их компонентов, использованием химических методов на всех стадиях исследования — для выделения, изучения структуры и функций нуклеиновых кислот и нуклеопротеидных комплексов.

Необходимо отметить, что химия нуклеиновых кислот, как и всякая химия высокомолекулярных веществ, имеет ряд существенных отличий от химии соответствующих мономерных компонентов. Уже нуклеозиды и нуклеотиды являются полифункциональными соединениями, хотя различие в реакционной способности определенных группировок, входящих в состав четырех обычных типов нуклеотидных звеньев, сравнительно невелико. Полинуклеотиды представляют собой гигантские молекулы с множеством реакционных центров. Особые сложности в химию нуклеиновых кислот вносят следующие обстоятельства. Реакционная способность отдельных группировок в нуклеотидных звеньях зависит не только от условий реакции (растворителя, pH, температуры и т. д.), но и от наличия и характера взаимодействия отдельных звеньев друг с другом (в одной и той же цепи и на комплементарном участке в двухспиральных двухцепочечных молекулах), а также взаимодействия с молекулами белков, ионами металлов и т. д. Все эти взаимодействия, как правило, кооперативны, т. е. нелинейно изменяются при изменении условий реакции. Модификация одного из звеньев полинуклеотидной цепи приводит к изменению характера и силы взаимодействия этого звена с соседними звеньями (или с молекулой белка в случае нуклеопротеидов), что в конечном счете сказывается на реакционной способности звеньев на обширных участках полинуклеотидной цепи.

Реакционная способность нуклеотидных звеньев, механизм и кинетика реакций, а также строение и свойства модифицированных звеньев в первом приближении могут быть изучены на мономерных соединениях обычными методами органической и физической химии. Однако для учета взаимодействий, сказывающихся на реакционной способности отдельных нуклеотидных звеньев в составе полимера, необходимо исследовать модельные полимерные соединения — олигонуклеотиды, монотонные одно- и двухспиральные полинуклеотиды и, наконец, гетерополинуклеотиды. Полученных в ходе подобных исследований данных в большинстве случаев бывает достаточно для рационального использования реакции при изучении структуры и функций нуклеиновых кислот.

Для изучения структуры и функций полинуклеотидов наиболее удобным представляется использовать высокоспецифические реакции, приводящие к образованию стабильных модифицированных звеньев с известными химическими и функциональными свойствами.

Однако, в сущности, не известно ни одной реакции, полностью отвечающей этим требованиям. Учитывая это, легко понять, насколько важно детальное изучение органической химии нуклеиновых кислот. К сожалению, зачастую результаты, полученные при использовании химических методов, трактуются весьма поверхностно и примитивно, что приводит лишь к дискредитации органохимических подходов к изучению структуры и функций нуклеиновых кислот.

Естественно, что глубина и объем органохимических исследований определяются той задачей, для решения которой будет использована реакция. В общем виде эти задачи можно сформулировать следующим образом:

1. Очистка и фракционирование олиго- и полинуклеотидов.
2. Изучение первичной структуры нуклеиновых кислот *.
3. Изучение высших структур нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов.
4. Исследование функциональных (биологических) свойств нуклеиновых кислот.

Химические методы, применяемые для выделения полинуклеотидов или нуклеиновых кислот, могут быть основаны на специфической реакционной способности минорных компонентов или концевых групп. Эти группы могут быть непосредственно или после предварительной химической модификации связаны с нерастворимым носителем или такой молекулой, которая резко изменяет физические свойства полинуклеотида (растворимость, коэффициенты распределения или седиментация и т. д.). Подобные методы нашли применение для выделения и фракционирования транспортных РНК.

Для изучения первичной структуры нуклеиновых кислот возможны три химических подхода: *а*) последовательное отщепление и определение концевых звеньев; *б*) специфическое расщепление полинуклеотидной цепи по определенным типам звеньев; *в*) специфическая модификация нуклеозидных звеньев полинуклеотида и пря-

* Здесь и далее мы используем термин «первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры нуклеиновых кислот» в следующем смысле. Первичная структура — последовательность нуклеозидных звеньев, соединенных фосфодиэфирной связью в непрерывную и неразветвленную полинуклеотидную цепь. Вторичная структура — в случае одноцепочечных, главным образом монотонных полинуклеотидов, — пространственное расположение нуклеозидных звеньев, обусловленное межплоскостным взаимодействием оснований. В случае двух комплементарных цепей вторичная структура представляет собой жесткую двойную спираль, стабилизованную как межплоскостным взаимодействием соседних оснований в пределах одной цепи, так и водородными связями между противолежащими основаниями в параллельных цепях. Третичная структура образуется в результате реализации наряду с двухспиральными иных типов фиксированной укладки полинуклеотидных цепей. Четвертичная структура — пространственное расположение взаимодействующих макромолекул (обычно полинуклеотидов и полипептидов) в нуклеопротеидах — рибосомах, вирусах и т. д.

мое электронно-микроскопическое определение распределения этих модифицированных звеньев вдоль цепи полимера.

Путь *а* (как при использовании чисто химических средств, так и при комбинированном использовании химических реакций и ферментов) предъявляет очень жесткие, практически в настоящее время еще недостижимые требования к специфичности и количественности протекающих химических и ферментативных реакций. Поэтому данный путь используется пока лишь для определения сравнительно коротких концевых последовательностей или для установления строения олигонуклеотидов, содержащих до десяти нуклеотидных остатков.

Путь *б* — специфическое расщепление полинуклеотидной цепи на блоки с последующей расшифровкой строения образующихся таким путем блоков и воссозданием первичной структуры исходного полимера — предъявляет значительно менее жесткие требования к специфичности и полноте протекания превращений. Расщепление проводится однократно, и возникающие при этом ошибки не накапливаются. Для избирательного расщепления полинуклеотидной цепи могут быть использованы химические или химико-ферментативные методы. В первом случае необходимо, чтобы химическая модификация приводила к лабилизации межнуклеотидных связей. Такие реакции, обладающие групповой специфичностью (разрушение всех пиримидиновых или отщепление всех пуриновых оснований), широко используются для изучения распределения нуклеотидов в молекуле ДНК. Аналогичные методы для РНК обладают более высокой специфичностью. Второй метод расщепления — химико-ферментативный — заключается в избирательном химическом изменении структуры определенных нуклеозидных звеньев, приводящем к повышению стабильности соответствующих межнуклеозидных связей к действию нуклеаз, и последующем действии нуклеаз. Так, после модификации урацильных ядер гидроксиламином или карбодиимидом панкреатическая рибонуклеаза расщепляет РНК только по цитидиновым звеньям, что равносильно использованию цитидил-рибонуклеазы, не найденной в природных объектах.

Однако блочный метод определения первичной структуры, несмотря на явные преимущества по сравнению с методом последовательного отщепления концевых фрагментов, принципиально не может быть применен при изучении высокомолекулярных полинуклеотидов. По мере увеличения длины цепи количество идентичных блоков возрастает, что приводит к неопределенности при воссоздании исходной структуры.

Для определения первичной структуры полинуклеотидов любого типа (РНК или ДНК) и любой длины в настоящее время наиболее перспективным кажется путь *в*. Принцип этого подхода состоит в специфической модификации (пометке) каждого из

2 Зак. 614

четырех нуклеотидов посредством определенной химической реакции, в результате чего последовательность мононуклеотидов в полимерной цепи можно непосредственно «рассматривать» под электронным микроскопом. Одна из ключевых проблем такого подхода — специфическое связывание определенных оснований с контрастирующей группой (один или несколько тяжелых атомов, сильно рассеивающих электроны) — может быть решена химическими методами. Попытки использования изложенного принципа предпринимаются, однако пока без большого успеха. Это, вероятно, объясняется использованием в настоящее время для введения контрастирующих групп таких реакций, специфичность и количественность которых исследованы явно недостаточно. Тем не менее если учесть, что для определения первичной структуры с помощью электронной микроскопии достаточно, по-видимому, 10^2—10^3 молекул полинуклеотида, то становится очевидной актуальность разработки методов специфического введения контрастирующих групп.

Как указывалось выше, реакционная способность нуклеотидных звеньев существенно зависит от наличия нековалентных взаимодействий с соседними звеньями; это позволяет использовать химические методы для изучения вторичной структуры нуклеиновых кислот. В частности, влияние комплементационных взаимодействий оснований на их реакционную способность настолько велико, что возможно избирательно модифицировать звенья полинуклеотидной цепи, находящиеся в односпиральных зонах, и таким образом определить состав и размеры этих зон. Если к тому же известна первичная структура молекулы, то возможно провести и локализацию таких односпиральных участков в цепи. Исследования такого рода широко проводятся во многих лабораториях при помощи реакций с формальдегидом, акрилонитрилом, водорастворимым карбодиимидом, гидроксиламином и другими агентами.

Значительно слабее влияет на реакционную способность оснований межплоскостное взаимодействие, однако и в этом случае эффект вполне достаточен; он используется при изучении структуры однонитевых полинуклеотидов и нуклеотидных коферментов.

Весьма перспективно использование химических методов для изучения высших структур нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов (фермент-субстратных комплексов, вирусов, рибосом и т. д.) в функционально активном состоянии. В этом направлении сделаны пока еще первые шаги, но полученные результаты дают все основания для оптимизма. Следует отметить, что при изучении первичной и высших структур нуклеиновых кислот добиваются, как правило, максимальной (в пределе — количественной) степени модификации определенного типа звеньев или изучают кинетику основной реакции. При этом механизм реакции, кинетика промежуточных стадий и строение промежуточных продуктов (а при изучении

высших структур — и специфичность реакции) не играют решающей роли. Зачастую допустим и довольно высокий уровень побочных реакций.

Существенно иного подхода требуют химические методы, используемые для функциональных (биологических) исследований нуклеиновых кислот. Во-первых, при функциональных исследованиях допустима, как правило, модификация лишь очень малого количества мономерных звеньев полимера, поэтому для корреляции химических и функциональных изменений необходимо располагать сведениями о механизме и кинетике основных и побочных реакций, строении и свойствах (включая функциональные свойства) не только конечных, но и промежуточных продуктов реакции. Во-вторых, поскольку модификации подвергается незначительное количество звеньев, важно знать не только их количество, но и распределение по цепи. В-третьих, модифицированные звенья разного строения могут иметь различные функциональные свойства, так что побочные реакции, даже если их скорость на порядки ниже скорости основной, могут вносить существенный вклад в изменение функциональных свойств полинуклеотида, затрудняя, а иногда и делая невозможной рациональную трактовку результатов. Последнее обстоятельство особенно важно учитывать при функциональных исследованиях генетических нуклеиновых кислот (ДНК, вирусных РНК). Применяемые методы детектирования позволяют обнаружить в этом случае изменения отдельных молекул полимера, которые могут содержаться в анализируемой смеси в незначительных количествах. При модификации же негенетических нуклеиновых кислот (например, транспортной РНК) удается наблюдать лишь суммарное изменение функциональных свойств, причем вклад каждого из модифицированных компонентов пропорционален его содержанию в смеси.

Совершенно ясно, что чем более достоверны и точны данные о специфичности, механизме и кинетике реакций, протекающих под действием химического агента, а также данные о строении и химических свойствах модифицированных звеньев, образующихся в ходе основной и побочных реакций, тем лучше можно будет понять химические основы функциональной специфичности нуклеиновых кислот.

Изложенный в этом разделе материал свидетельствует об огромных возможностях и перспективах развития органической химии нуклеиновых кислот. Поэтому чрезвычайно важным представляется детальное изучение механизмов и кинетики реакций компонентов нуклеиновых кислот с различными агентами; поиск и разработка новых специфических реакций; исследование влияния условий реакции на реакционную способность компонентов нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов; выяснение характера и природы нековалентных взаимодействий компонентов нуклеиновых кислот друг с другом, с белковыми молекулами, ионами металлов и т. д.

Нет сомнений в том, что в ближайшие годы гармоничное развитие органической и синтетической химии, физической химии и биохимии нуклеиновых кислот позволит еще глубже проникнуть в сущность процессов, протекающих в живой клетке, понять химические механизмы биосинтеза и регуляции, лежащие в основе метаболизма.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ОБЗОРНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Levene P., Bass L. W., Nucleic Acids, Chem. Catalog Co., N. Y., 1931.
Jordan D. O., Chemistry of the Nucleic Acids, Butterworth, L., 1960.
Steiner R. F., Beers R. F., Polynucleotides, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1961.
Allen F. W., Ribonucleoproteins and Ribonucleic Acids, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1962.
Brown D. M., Ulbricht T. L. V., in «Comprehensive Biochemistry», v. 8, Florkin M., Stolz E. H. (eds), Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1963, p. 157.
Harbers E., Die Nukleinsäuren, Thieme Verlag, Stuttgart, 1964.
Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966.
Chargaff E., Davidson J. N. (eds), The Nucleic Acids, v. 1, 2 (1955), v. 3 (1960), Academic Press, N. Y.—L. (отдельные главы из т. 1, 2 переведены в сб. «Нуклеиновые кислоты», Издатинлит, 1957; т. 3 переведен: «Нуклеиновые кислоты», Издатинлит, 1962).
Davidson J. N., Cohn W. E. (eds), Progress in Nucleic Acid Research, v. 1, 2 (1963), v. 3 (1964), v. 4 (1965), v. 5 (1966), v. 6, 7 (1967), v. 8 (1968), v. 9 (1969), Academic Press, N. Y.—L. (перевод т. 1: «Нуклеиновые кислоты», Изд «Мир», 1965; отдельные главы из т. 2 и 3: «Нуклеиновые кислоты», Изд «Мир», 1966).
Дэвидсон Дж., Биохимия нуклеиновых кислот, Изд. «Мир», 1968.
Химия и биохимия нуклеиновых кислот под ред. Збарского И. Б., Дебова С. С., Изд. «Медицина», 1968.

СИМВОЛЫ И СОКРАЩЕННЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ, ИХ КОМПОНЕНТОВ И ПРОИЗВОДНЫХ

При написании любого обзорного труда авторы сталкиваются с трудной задачей приведения в более или менее стройную систему символов и сокращений, использованных в многочисленных оригинальных работах. Особенно сложна эта задача для такой бурно развивающейся области, как химия нуклеиновых кислот. Отсутствие единой системы, а также невозможность строгого проведения какого-либо бесспорного логического принципа делает эту задачу почти неразрешимой или, точнее, весьма уязвимой для критики, так как понятие «приемлемость» весьма субъективно. Однако, руководствуясь рекомендациями комиссии по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного союза биохимиков (IUB), 3-е Всесоюзное рабочее совещание по химии нуклеотидов приняло правила, предусматривающие унификацию символики нуклеиновых кислот, их компонентов и произвольных. Эти правила, приведенные ниже, авторы использовали при написании книги. Хотелось бы надеяться, что в дальнейшем эти правила с минимальными изменениями станут общепринятыми и существенно облегчат читателям понимание не только данной книги, но и обзоров и оригинальных работ, публикуемых в отечественной и иностранной печати.

I. АЛФАВИТ

Использование кириллицы допускается только для широко распространенных аббревиатур — ДНК, РНК и приставки «поли» в названиях полимеров. Во всех остальных случаях необходимо использовать только латинский алфавит.

II. НУКЛЕОЗИДЫ

1. Обычные нуклеозиды обозначаются первой буквой латинского названия:

A — аденозин
G — гуанозин
C — цитидин
U — уридин
T — риботимидин
N — любой нуклеозид

2. Для некоторых минорных компонентов нуклеиновых кислот используют следующие символы:

I — инозин
X — ксантозин
Ψ — псевдоуридин
$\overset{H}{U}$ — 5,6-дигидроуридин
$\overset{S}{U}$ — тиоуридин
$\overset{H_2O}{C}$ — 6-окси-5,6-дигидроцитидин.

Другие одно- и двухбуквенные символы для этих нуклеозидов (SU, H, HU, CH и др.) использовать не рекомендуется.

3. Присутствие в нуклеозиде остатка 2′-дезоксирибозы обозначается символом «d», который ставится перед символом нуклеозида; при отсутствии его подразумевается рибонуклеотид.

Например: T — риботимидин (тиминрибозид); dT — тимидин (тимин-2′-дезоксирибозид).

4. В олигонуклеотидах, если все составляющие — нуклеозидные звенья дезоксиряда, символ «d» ставится либо перед символом каждого нуклеозида, либо перед символом всего олигомера. В последнем случае символ олигонуклеотида заключается в скобки.

Например: pdApdTpdCpdG или d(pApTpCpG).

Если в олигонуклеотиде одни составляющие нуклеозиды являются производными 2′-дезоксирибозы, а другие производными рибозы, то символ «d» ставится перед каждым дезоксирибозидным звеном.

Например: pApTpdGpC.

5. В случае присутствия иных (кроме рибозы и 2′-дезоксирибозы) пентозных остатков перед символом нуклеозида ставятся символы сахара: a — арабинозы, x — ксилозы и l — ликсозы.

Например: aC — арабинозилцитозин; xU — ксилозилурацил; lG — ликсозилгуанин.

6. Для α-аномеров перед символом нуклеозида пишется знак «α».

Например: αC — α-рибозилцитозин; αdA — α-2′-дезоксирибозиладенин.

7. В тех работах, где упоминаются одновременно основания нуклеиновых кислот и нуклеозиды, во избежание недоразумений, могущих возникнуть при использовании однобуквенных символов, можно использовать следующие трехбуквенные символы.

Основания:

Ade — аденин
Cyt — цитозин
Gua — гуанин
Ura — урацил
Hyp — гипоксантин
Xan — ксантин
Thy — тимин
Oro — оротовая кислота

Нуклеозиды:

Ado — аденозин
Cyd — цитидин
Guo — гуанозин
Urd — уридин
Ino — инозин
Xao — ксантозин
Thd — риботимидин
Ord — оротидин
dAdo — 2′-дезоксиаденозин и т. д.

Puo — любой пуриновый нуклеозид
Pyd — любой пиримидиновый нуклеозид

8. Для других нуклеозидов вплоть до общего соглашения можно вводить в каждой статье свои обозначения со следующими ограничениями:

а) сокращение должно быть написано латинским алфавитом;

б) сокращение не должно совпадать ни с одним общепринятым (для других соединений или группировок);

в) внутри сокращения не должно быть дефисов или запятых;

г) значения этих сокращений должны быть оговорены в каждой публикации.

III. ЗАМЕЩЕНИЕ ПО САХАРНОМУ ОСТАТКУ

1. Для обозначения остатка моноэфира фосфорной кислоты

$$-O-P(=O)(OH)_2$$

употребляется символ «p». Этот же символ применяется и для обозначения остатка диэфира фосфорной кислоты

$$-O-P(=O)(OH)-O-$$

в пирофосфатах и олигонуклеотидах. В последнем случае символ «p» ставится между символами двух нуклеозидных звеньев, связанных фосфодиэфирной связью. Для обозначения остатка диэфира фосфорной кислоты в олиго- и особенно в полинуклеотидах употребляется также знак «-» (дефис).

Например:

pApGpUpC или pA-G-U-C

···pApCpU··· или ····A-C-U···

2. Символ заместителя (в том числе и фосфатных групп), если он располагается слева от символа нуклеозида, обозначает замещение у 5′-гидроксильной группы сахарного остатка. Символ, записываемый справа от символа нуклеозида, — замещение у 3′-гидроксильной группы.

Например: Ap — аденозин-3′-фосфат, pU — уридин-5′-фосфат, pppdG — 2′-дезоксигуанозин-5′-трифосфат, pCp — цитидин-3′,5′-дифосфат.

Символ фосфатной группы, расположенной у 2′-гидроксильной группы рибозы рибонуклеозида, помещается справа от символа нуклеозида, и между ними в скобках отмечается положение заместителя.

Например: G(2′)p — гуанозин-2′-фосфат.

3. Бифункциональный фосфатный заместитель, присоединенный по 2′,3′-положениям нуклеозида, помещается справа от символа нуклеозида и отделяется от него знаком «>».

Например: C > p — цитидин-2′,3′-циклофосфат.

Если бифункциональный фосфатный заместитель присоединен по 3′,5′- или 2′,5′-положениям, то перед знаком «>» в скобках пишутся цифры, указывающие положение этого заместителя.

Например: A(3′,5′) >p — аденозин-3′,5′-циклофосфат.

4. Для других (кроме фосфатных) заместителей по гидроксильным группам сахарного остатка нуклеозидов могут быть рекомендованы следующие символы:

Me — метил
Et — этил
Ac — ацетил
Bz — бензоил (не бензил)
Tr — тритил

IV. ЗАМЕЩЕНИЕ ПО ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМ ОСНОВАНИЯМ

Символы заместителей в гетероциклических основаниях мономерных компонентов нуклеиновых кислот и олиго- и полинуклеотидов рекомендуется помещать над символом соответствующего нуклеозида. Положение такого заместителя указывается верхним цифровым индексом при символе заместителя, число замещающих групп — нижним индексом.

Например: $\overset{Me^1}{pA}$ — 1-метиладенозин-5′-фосфат (замещение по основанию); $\cdots$-A-U-C-C-$\overset{Me_2}{G}$-A$\cdots$ — полинуклеотид с остатком диметилгуанозина в цепи (замещение по основанию).

V. ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

1. В олигонуклеотидах (или фрагментах полинуклеотидов) с известной последовательностью и природным (3′ → 5′) типом межнуклеозидной фосфодиэфирной связи символы нуклеозидов разделяются символом «р» или «-» (дефисом).

Например: pApGpApT или pA-G-A-T

Для полинуклеотидов предпочтительно использование знака «-» (дефис).

Например: $\cdots$-A-C-G-G-C-U-G-A-A-U$\cdots$

При любом способе сокращенной записи полинуклеотидной последовательности ее следует располагать так, чтобы справа находился 3′-конец цепи, слева — 5′-конец. Это в равной мере относится как к полной последовательности полинуклеотида, так и к его отдельным фрагментам.

Например:

5′-конец 3′-конец

pG-A-U$\cdots$-A-U-U-U-C-G-A-G-U$\cdots$-C-C-A

2. Если последовательность звеньев неизвестна, символы нуклеозидов заключают в скобки и разделяют запятыми.

Например: $\cdots$(A, G, C)$\cdots$

Частично известные последовательности обозначаются следующим образом (пример):

$\cdots$-G-C-(A, G)-C$\cdots$

3. Концевые фосфатные и пирофосфатные группировки в олиго- и полинуклеотидах обозначаются символами «р», «рр» и т. д.

Например: pppA-C-G-U-$\cdots$

4. В случае неприродной межнуклеозидной фосфодиэфирной связи рядом с символом межнуклеотидной связи в скобках указываются номера атомов, при которых находятся гидроксильные группы, образующие фосфоэфирную связь.

Например:

Cp(2′→5′)A или C-(2′→5′)A — цитидилил-(2′→5′)-аденозин

U(5′→5′)pU или U(5′→5′)-U — уридилил-(5′→5′)-уридин

VI. ПРИРОДНЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

1. Природные полинуклеотиды обозначаются тривиальными аббревиатурами и записываются кириллицей; функциональная характеристика отмечается строчной буквой перед аббревиатурой, которая от нее не отделяется ни интервалом, ни дефисом, ни запятой:

рРНК — рибосомальная РНК
иРНК — информационная РНК
тРНК — транспортная РНК

В ряде случаев для характеристики РНК используются константы седиментации. В таких случаях характеристика отделяется от аббревиатуры интервалом и рекомендуется следующий способ написания (пример):

16S РНК — РНК, имеющая константу седиментации 16 единиц Сведберга.

2. Индивидуальные транспортные РНК помечаются справа вверху символом соответствующей аминокислоты.

Например: $тРНК^{Val}$ — индивидуальная тРНК, способная акцептировать и переносить остаток валина.

Для изоакцепторных тРНК пишется дополнительный индекс справа внизу.

Например: $тРНК_1^{Val}$; $тРНК_2^{Ser}$.

Аминоацилированные индивидуальные тРНК обозначаются, например, так: $Val—тРНК_1^{Val}$; $Ala—тРНК^{Cys}$.

VII. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

1. Монотонные полинуклеотиды с неизвестным числом звеньев обозначаются поли-N или $(N)_n$. Если точное или среднестатистическое число звеньев известно, то рекомендуется следующее написание (пример):

U_{10} — декауридиловая кислота

$U_{\overline{10}}$ — олигоуридиловая кислота со средним числом нуклеотидных звеньев в цепи, равным 10.

2. Смешанные полинуклеотиды с известной последовательностью записываются следующим образом (пример):

поли-(A-U) или $(A\text{-}U)_n$ — полимер аденилилуридиловой кислоты.

Если распределение нуклеотидных звеньев вдоль цепи статистическое или неизвестно, то полимеры записываются, например, так:

поли-(A, C) или $(A, C)_n$ — сополимер адениловой и цитидиловой кислот с соотношением мономерных единиц 1 : 1;

поли-(G_2, C) или $(G_2, C)_n$ — сополимер гуаниловой и цитидиловой кислот с соотношением мономерных единиц 2 : 1;

$(A_2U)_{\overline{50}}$ — сополимер адениловой и уридиловой кислот с соотношением мономерных единиц 2 : 1 и средним числом звеньев 150;

поли-(dA-dT), или поли-d(A-T), или $(dA\text{-}dT)_n$, или $[d(A\text{-}T)]_n$ — полимер дезоксиаденилилдезокситимидиловой кислоты.

В случае изображения полной последовательности нуклеотидных звеньев в полимере или ее части, прилегающей к какому-либо концу цепи, концевые группировки обозначаются особо (см. раздел V. 3).

VIII. КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ПАРЫ

1. Комплементарные пары оснований при упоминании в тексте пишутся через точку.

Например: «...прочность взаимодействия комплементарной пары гуанин · цитозин выше, чем для пары аденин · тимин...».

Аналогично изображаются и комплементарные пары нуклеозидов.

Если речь идет о составе полинуклеотида, то мономерные составляющие единицы разделяются знаком «+».

Например: «...повышение содержания в ДНК гуанина + цитозина приводит к повышению T_m...».

2. При изображении развернутых структур комплементарные (поперечные) взаимодействия обозначаются точками:

```
Например: ••••-A-G-U-C-G•••
               •  •  •  •  •
          ••••-U-C-A-G-C•••
```

3. В случае двухспиральных двухцепочечных комплексов сокращенные названия компонентов комплекса разделяются точкой.

Например: (поли-A) · (поли-U) или $(A)_n \cdot (U)_n$ — двухспиральный комплекс полиадениловой и полиуридиловой кислот.

ГЛАВА 1

СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

I. ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновыми кислотами принято называть фосфорсодержащие биополимеры, построенные из остатков нуклеозидов — N-гликозидов пентоз, производных гетероциклических оснований ряда пурина или пиримидина; остатки нуклеозидов соединены в полимерной цепи фосфодиэфирными связями. При расщеплении нуклеиновых кислот образуются с высоким выходом нуклеозиды или их фосфорные эфиры — нуклеотиды.

Углеводный компонент нуклеиновых кислот может быть *D*-рибозой или 2-дезокси-*D*-рибозой.

1 CHO
2 —OH
3 —OH
4 —OH
5 CH_2OH

1 CHO
2
3 —OH
4 —OH
5 CH_2OH

В соответствии с этим различают рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК).

Нуклеозиды являются β-N-пентофуранозидами гетероциклических оснований, их структуру можно представить формулами I—IV. Обычно как в состав РНК, так и в состав ДНК входят остатки по меньшей мере четырех нуклеозидов. Обычными компонентами РНК являются аденозин Iа, гуанозин IIа, цитидин IIIа и уридин IVа; в случае ДНК из четырех наиболее часто встречающихся нуклеозидов три — дезоксиаденозин Iб, дезоксигуанозин IIб и дезоксицитидин IIIб — содержат те же основания, что и рибонуклеозиды, а четвертый — тимидин IVб — отличается от соответствую-

щего рибонуклеозида (уридина) наличием дополнительной метильной группы в гетероциклическом основании.

Iа (R=OH)
Iб (R=H)

IIа (R=OH)
IIб (R=H)

IIIа (R=OH)
IIIб (R=H)

IVа (R=OH, R′=H)
IVб (R=H, R′=CH_3)

Нуклеозиды, являющиеся мономерными составляющими нуклеиновых кислот, связаны друг с другом фосфодиэфирными связями и образуют цепь полинуклеотида. Фосфодиэфирная группировка связывает между собой 3′-гидроксильную группу остатка одного нуклеозида с 5′-гидроксильной группой остатка соседнего нуклеозида. Таким образом, полинуклеотидная цепь нуклеиновых кислот представляет собой линейную структуру, в которой мононуклеозиды связаны между собой 3′,5′-фосфодиэфирными связями, причем мононуклеозиды расположены в цепи в строго определенной для данной нуклеиновой кислоты последовательности. Об-

щая структура РНК и ДНК может быть представлена приведенной ниже формулой V:

V

B′....B′....B″—остатки оснований

R = H (в случае ДНК)

R = OH (в случае РНК)

Как видно из схемы, в дезоксирибонуклеиновой кислоте все мономерные звенья, за исключением концевых, не содержат свободных гидроксильных групп; в рибонуклеиновых кислотах, напротив, мономерные звенья полинуклеотидной цепи имеют свободную гидроксильную группу при С-2′, соседнюю с фосфодиэфирной группировкой. Это различие в структуре определяет глубокое различие в физико-химических свойствах РНК и ДНК.

Решающее значение для понимания биологических функций нуклеиновых кислот имело выяснение того факта, что возможно специфическое нековалентное взаимодействие между определенными парами оснований, входящими в состав остатков нуклеозидов полинуклеотидной цепи. Такое взаимодействие за счет образования водородных связей происходит между так называемыми «комплементарными парами» оснований; таковыми являются пары

природных оснований аденин — тимин (VIа) и гуанин — цитозин (VIб).

VIа

VIб

Предположение о существовании такого взаимодействия было впервые высказано при изучении макромолекулярной структуры ДНК (гипотеза Уотсона — Крика) *; в дальнейшем это предположение получило обширное экспериментальное подтверждение (подробнее см. гл. 4) и является в настоящее время одним из краеугольных камней молекулярной биологии и молекулярной генетики.

Наряду с белками, полисахаридами и липидами, нуклеиновые кислоты являются необходимыми компонентами всех живых клеток, причем в их состав обычно входит как РНК, так и ДНК. Более того, нуклеиновые кислоты входят в состав более простых, паразитических форм жизни — вирусов. Частицы вирусов состоят часто лишь из белка и ДНК или РНК.

Для гистохимического и цитохимического обнаружения нуклеиновых кислот в живых клетках (обзоры и монографии — см. [1-3]) используют обычно характерное УФ-поглощение нуклеиновых кислот и специфические цветные реакции, основанные на высвобождении восстанавливающих групп остатков 2-дезоксирибозы при мягком кислотном гидролизе (реакция Фельгена для ДНК) или на способности полинуклеотидов образовывать комплексы с основными красителями (реакция Браше для РНК; люминесцентные методы, основанные на взаимодействии с акридиновым оранжевым). Весьма существенным признаком, который позволяет надежно идентифицировать вещество, дающее упомянутые выше реакции на срезе ткани, как ДНК или РНК, является исчезновение характерного УФ-поглощения или цитохимической реакции после обработки среза препаратами нуклеаз — ферментов, катализирующих расщепле-

* Для ДНК характерно существование в растворах в виде комплексов, образующихся из двух полинуклеотидных цепей, которые стабилизуются за счет взаимодействия комплементарных оснований различных цепей и гидрофобного взаимодействия между основаниями в одной и той же цепи. Такие комплексы называют двухцепочечными, двухнитевыми или двухтяжевыми.

ние полимерных нуклеиновых кислот до низкомолекулярных соединений *.

Этот признак — расщепление полимерного препарата до низкомолекулярных соединений под действием РНК-аз или ДНК-аз (нуклеаз, расщепляющих соответственно РНК и ДНК) — имеет решающее значение и при идентификации выделенного из клетки полимера как нуклеиновой кислоты; другие характерные свойства препаратов нуклеиновых кислот — это ультрафиолетовое поглощение с максимумом около 260 *ммк* и присутствие фосфора и рибозы или 2-дезоксирибозы, что можно легко доказать соответствующими колориметрическими реакциями (обзоры — см.[5, 494]).

II. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ДНК. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ ДНК

Как уже отмечалось, ДНК является необходимым компонентом всех живых клеток, а также входит в состав многих вирусов. К их числу относится большинство бактериофагов и вирусов насекомых и почти все известные вирусы животных.

Главной задачей при выделении ДНК из природных объектов является отделение ДНК от других биополимеров — белка, РНК и полисахаридов.

В современных методиках выделения ДНК (обзоры — см.[6–8]) основной стадией является обычно экстракция биологического материала фенолом[9]. При этом ДНК после разделения слоев переходит в водный слой или остается в виде осадка в интерфазе, а бо́льшая часть белка денатурирует и переходит в фенольный слой. Для удаления белка из препаратов ДНК используют также обработку детергентами[10], смесью хлороформ — изоамиловый (или октиловый) спирт[11, 12], а также инкубацию с протеолитическими ферментами, например с проназой[13]. РНК отделяют от ДНК фракционным осаждением спиртом и обработкой препарата рибонуклеазами. Бо́льшая часть полисахаридов обычно удаляется при фракционном осаждении этанолом или изопропанолом; в некоторых случаях приходится применять дополнительную очистку (экстракция метилцеллозольвом, фракционирование цетавлоновых солей, электрофорез).

Специфической проблемой при выделении ДНК является крайняя чувствительность длинных линейных молекул к гидродинамическому сдвигу. При перемешивании или фильтровании раствора и засасывании его в пипетку в линейных молекулах большой

---

* Специфичность и механизм действия нуклеаз более подробно рассмотрены в разделе об определении последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах (см. стр. 67); обсуждение других вопросов, касающихся нуклеаз, можно найти в недавно вышедшей монографии[4].

длины возникают напряжения, достаточные для разрыва ковалентных связей[14], что приводит к фрагментированию молекул ДНК. Вследствие этого в современных методиках выделения ДНК подобные операции стараются свести до минимума, хотя это и может приводить к уменьшению выхода ДНК и худшей депротеинизации[15]. Полученные препараты ДНК характеризуют обычно молекулярным весом и составом оснований.

Для определения молекулярного веса ДНК (обзоры — см.[7, 16, 17]) наиболее широко используются методы, основанные на определении скорости седиментации макромолекул. Это определение может быть выполнено по различным методикам; наиболее широкое распространение в последнее время приобрела методика, основанная на зональном центрифугировании в градиенте плотности сахарозы в препаративной ультрацентрифуге[18, 21]. В данном случае распределение веществ по скорости осаждения можно контролировать по радиоактивной метке, что обеспечивает высокую чувствительность; с другой стороны, методика практически без изменений может быть применена и для препаративного разделения нуклеиновых кислот. Предложен ряд эмпирических уравнений, связывающих скорость седиментации двухцепочечного комплекса ДНК со значением молекулярного веса[19–24], определенным независимыми методами. Последнее из этих уравнений[24] охватывает пределы мол. веса 0,2—130 · 10^6.

Подобное же эмпирическое уравнение было предложено для зависимости вязкости от молекулярного веса для двухцепочечных комплексов ДНК[24]. Ограниченное применение для определения молекулярного веса находят методы светорассеяния[7], они пригодны приблизительно до значений мол. веса 25 · 10^6.

Единственно надежным абсолютным методом определения молекулярного веса, используемым для высокополимерной ДНК, является метод[20], основанный на авторадиографии молекул ДНК, меченных ^{32}P; подсчет «звезд» на эмульсии фотопластинки позволяет определить количество атомов фосфора в исследуемой молекуле. Этот метод является весьма трудоемким и использован лишь в немногих случаях. Гораздо шире применяется другой метод, основанный на непосредственном наблюдении молекул ДНК — измерение длины молекул под электронным микроскопом[25] (обзор — см.[26]). Исходя из данных рентгеноструктурных исследований двухспиральных комплексов ДНК, показывающих, что длине двухцепочечного комплекса 1 Å соответствует мол. вес. 192, можно определить значение молекулярного веса полученного препарата. Наконец, в последнее время начали применять методы определения молекулярного веса, основанные на химическом определении концевых групп (см. стр. 44).

Для определения нуклеотидного состава ДНК используют обычно количественную хроматографию пуриновых и пиримидино-

вых оснований или нуклеотидов, полученных после расщепления полимера (подробнее — см. стр. 58). С нуклеотидным составом ДНК однозначно связаны два физических свойства двухцепочечных комплексов, которые часто используются для характеристики полученных препаратов [27, 28]. Одно из них — так называемая «температура плавления» T_m — это температура, при которой происходит распад двухцепочечного комплекса на одноцепочечные молекулы; этот процесс легко наблюдать по изменению УФ-поглощения или оптического вращения раствора (подробнее см. в гл. 4). Другая характерная константа ДНК — «плавучая плотность» ρ — может быть определена из результатов равновесного ультрацентрифугирования [29]. Такое центрифугирование проводят обычно в растворах солей, обладающих высокой плотностью; чаще всего применяют хлорид или сульфат цезия. При длительном центрифугировании устанавливается градиент плотности раствора, а ДНК собирается в узкой зоне, где существует равновесие между центробежной силой и выталкивающей силой, которая определяется разностью плотности осаждаемого вещества и применяемого солевого раствора в данной зоне. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности Cs Cl может служить не только аналитическим методом для характеристики препарата ДНК, но и полезным препаративным методом для разделения ДНК, различающихся по нуклеотидному составу. Подобным же образом препаративное ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы используется для разделения молекул ДНК, различающихся по скорости седиментации.

Для фракционирования ДНК могут быть использованы и хроматографические методы. Наибольшее распространение получила хроматография на колонках с метилированным альбумином на кизельгуре (МАК) [30] или с фосфатом кальция (оксиапатитом) [31]. В последнее время для фракционирования ДНК начинают применяться и методы противоточного распределения [32]; для этой цели используют распределение между несмешивающимися водными растворами декстрана и полиэтиленгликоля.

ДНК вирусов и фагов (обзоры — см. [33–36, 495]). Выделение ДНК из вирусов является относительно простой задачей, поскольку вирусные частицы могут быть получены в высокоочищенном состоянии и во многих случаях для получения ДНК необходимо лишь отделить белок. В этом случае можно применять максимально мягкие методы выделения [37], например депротеинизацию концентрированным раствором перхлората натрия [38]. Операции, вызывающие гидродинамический сдвиг, можно свести к минимуму, и ДНК вирусов удается получать в высокополимерном состоянии. Процесс выделения вирусных ДНК и их нативность легко контролировать, так как эти соединения имеют легко измеряемую количественно биологическую активность (инфекционность).

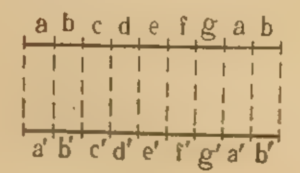
Бо́льшая часть вирусов и фагов содержит ДНК в виде двухцепочечного комплекса с мол. весом $30-200 \cdot 10^6$. Излюбленным объектом для выделения фаговых ДНК являются бактериофаги серии Т, поражающие *Escherichia coli*; значительное внимание было уделено также изучению ДНК бактериофагов λ, α и SP8. Из вирусов животных наиболее подробно изучались ДНК вирусов простого герпеса, осповакцины, а также вирусов полиомы, папилломы и аденовирусов (ДНК последних имеет значительно меньший молекулярный вес — порядка $4-5 \cdot 10^6$).

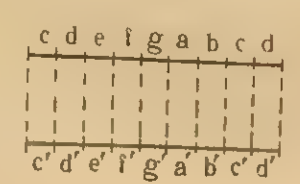
Существует группа мелких бактериофагов (ФХ174, fd, S13 и др.), в состав которых входит одноцепочечная ДНК с довольно низким молекулярным весом. Для ДНК бактериофага ФХ174 найдено значение мол. веса $1,7 \cdot 10^6$.

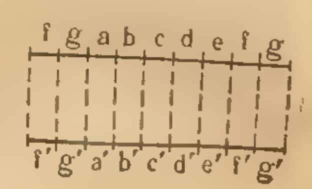
Из клеток, зараженных фагом ФХ174, наряду с одноцепочечной ДНК, присутствующей в вирусных частицах, можно с помощью центрифугирования в градиенте плотности и хроматографией на МАК получить двухцепочечный комплекс ДНК с вдвое большим молекулярным весом [39] — так называемую «репликативную форму» ДНК фага ФХ174. Присутствие в зараженной вирусом клетке форм вирусной ДНК, отличающихся по своей структуре от ДНК вирусных частиц, показано и для многих других вирусов.

Определение содержания ДНК на одну вирусную частицу показывает, что обычно в состав частицы входит либо одна молекула ДНК, либо один двухцепочечный комплекс. Естественно поэтому ожидать, что препараты ДНК, выделенные из вирусов, будут индивидуальными в химическом смысле молекулами ДНК или по крайней мере комплексами из двух индивидуальных молекул. Это предположение оправдывается во многих случаях, причем иногда удается после разрушения двухцепочечного комплекса разделить с помощью равновесного центрифугирования индивидуальные полинуклеотидные цепи.

Однако не всегда дело обстоит так просто. В некоторых случаях макромолекула ДНК фаговой частицы состоит не из двух длинных полинуклеотидных цепей, а из нескольких более коротких цепей (например, ДНК фага Т5). В других случаях (в частности, ДНК фага Т2) препарат ДНК из вирусных частиц содержит смесь молекул, отличающихся по своей химической структуре за счет «циклически переставленных» фрагментов, как, например







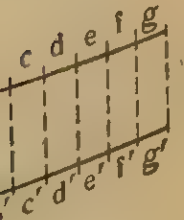
где *a*, *b*, ..., *g* — некоторые участки одной полинуклеотидной цепи, а *a′*, *b′*, ..., *g′* — комплементарные участки другой цепи.

ДНК клеточного ядра (обзоры — см. [7, 17, 40–42]). В ядре клеток бактерий и других микроорганизмов ДНК можно наблюдать в виде нитевидных структур, толщина которых, по данным электронной микроскопии, соответствует толщине двухспирального комплекса ДНК [43].

Генетические данные позволяют предположить, что в состав клеточного ядра бактерий входит одна молекула ДНК чрезвычайно высокого молекулярного веса. После разрушения бактерий в очень мягких условиях удалось наблюдать [44] с помощью метода авторадиографии структуры ДНК, длина которых соответствует мол. весу $\sim 2800 \cdot 10^6$. Современные методы выделения нуклеиновых кислот не позволяют получить такие огромные молекулы в интактном состоянии. Даже при самом тщательном выделении препараты ДНК имеют значительно меньший молекулярный вес. Так, из *Hemophilis influenzae* получен препарат ДНК [45, 46], поведение которого при ультрацентрифугировании и длина под электронным микроскопом соответствуют мол. весу $400 \cdot 10^6$, а из *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* — препараты [13] с мол. весом $\sim 250 \cdot 10^6$. Полученные образцы содержат довольно значительное количество белка и РНК; при более эффективной депротеинизации и удалении РНК молекулярный вес падает [47, 48] до $120 \cdot 10^6$. При обычных же методиках получения ДНК [8, 12, 37, 49, 50] выделяют двухцепочечный комплекс с мол. весом $10 - 30 \cdot 10^6$ (это соответствует приблизительно одной сотой части интактной молекулы бактериальной ДНК). Естественно ожидать, что полученные препараты бактериальной ДНК являются многокомпонентными смесями и выделение индивидуальных соединений из этих смесей представляется при современных методах фракционирования весьма затруднительным.

Генетические данные показывают, что помимо основной массы ДНК бактерии внутри клетки имеются элементы генетического материала, которые могут функционировать независимо. Такие элементы известны под названием «эписом» или «плазмид»; некоторые из них были выделены и идентифицированы как двухцепочечные комплексы ДНК с относительно низким молекулярным весом [51–55]. Представляется вероятным, что полученные препараты эписомных ДНК являются химически индивидуальными соединениями.

В ядрах клеток высших животных и растений ДНК входит в состав сложного морфологического образования — хромосомы [56, 57], главным компонентом которого помимо ДНК являются основные белки — гистоны, в небольших количествах присутствует также РНК и негистонные белки. Молекулярная организация хромосом сложна и еще не вполне выяснена; установлено, во всяком случае, что внутри одной клетки содержится набор гетерогенных молекул ДНК. Вопрос о размерах интактных молекул ДНК внутри



хромосом остается открытым. Авторадиографическим методом удалось наблюдать[58] нити ДНК, достигающие длины 1,8 *мм*, что приблизительно вдвое превосходит длину молекул интактной бактериальной ДНК[44]; в другой работе[59] получены даже нити длиной более 2 *см*. Так или иначе, существующие методы выделения ДНК из тканей животных[37, 60] приводят к препаратам существенно меньшего молекулярного веса ($50—60 \cdot 10^6$).

Хотя доступные в настоящее время препараты ДНК бактерий, животных и растений, несомненно, представляют собой многокомпонентные смеси, эффективного их фракционирования с помощью существующих методов добиться не удается. В отдельных случаях, однако, удается получить данные, указывающие на присутствие в суммарном препарате ДНК полинуклеотидов, отличающихся по своим свойствам от основной массы ДНК клеточного ядра и являющихся, таким образом, особыми разновидностями ДНК. Так, из препаратов ДНК бактерий при фракционировании с помощью противоточного распределения, центрифугирования в градиенте сахарозы, хроматографии на фосфате кальция или колонках с МАК получены фракции, свойства которых соответствуют свойствам одноцепочечной ДНК (см., например,[61–65]); предполагается, что такая ДНК является промежуточным продуктом при воспроизведении ДНК в клетке.

При равновесном центрифугировании в градиенте плотности CsCl препаратов ДНК многих животных и растений было обнаружено присутствие наряду с основным пиком ДНК небольшого пика «спутника»[66, 67]. В ряде случаев было доказано, что возникновение «спутника» связано с присутствием в препарате внеядерной ДНК (см. ниже). В других случаях, прежде всего в ДНК из тканей млекопитающих, показано, что ДНК-«спутник» * локализована в клеточном ядре. Наиболее изучены два представителя таких полинуклеотидов: ДНК-«спутник» из печени мышей[66–70, 498] и ДНК-«спутник» из тканей некоторых видов крабов[71–73]. Их количество составляет от 10 до 30% общего количества ДНК клеточного ядра; мол. вес. ДНК-«спутника» мышей найден равным $40 \cdot 10^6$. Эти полинуклеотиды существуют в виде двухцепочечных комплексов; характерным их свойством[74] является легкая ренатурируемость, т. е. способность двухцепочечного комплекса восстанавливаться после разрушения.

Внеядерная ДНК (обзоры — см.[75–78, 503]). Хотя, по цитохимическим данным, основная масса ДНК сосредоточена в клеточном ядре, было показано присутствие ДНК и в других субклеточных частицах[79]. Этот цитохимический вывод подтвержден выделением ДНК из митохондрий и хлоропластов.

* В русской литературе для названия этого класса полинуклеотидов иногда употребляют термин «сателлитная ДНК». По нашему мнению, термин ДНК-«спутник» ближе по смыслу к английскому термину «satellite» DNA.

Выделение ДНК из митохондрий [80–82] основано на тех же методах, которые используются для выделения ДНК из клеточного ядра; в этом случае, однако, предварительно выделяют соответствующие субклеточные частицы и перед разрушением обрабатывают их ДНК-азой, что позволяет удалить возможную примесь ядерной ДНК. Исследование физических свойств митохондриальных ДНК, выделенных из разных источников, показывает, что во многих случаях этот вид ДНК отличается от ядерной ДНК по плавучей плотности и температуре плавления и, следовательно, имеет другой нуклеотидный состав. Митохондриальная ДНК имеет мол. вес [83–87] около $10 \cdot 10^6$ и существует в виде двухцепочечного комплекса, который обладает способностью легко ренатурировать.

Для выделения ДНК из хлоропластов [88–90] используют тот же самый прием, что и при выделении митохондриальной ДНК, — обработку субклеточных частиц ДНК-азой перед их разрушением. В этом случае, однако, не удается добиться полного удаления ядерной ДНК, и ДНК хлоропластов очищают далее равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl. Наиболее подробному исследованию подвергалась ДНК из хлоропластов зеленой водоросли *Euglena gracilis* [91]; она отличается от ДНК ядра по составу оснований и существует в виде двухцепочечного комплекса с мол. весом $10 \cdot 10^6$.

Изложенный материал показывает, что внутри каждой живой клетки существует несколько типов дезоксирибополинуклеотидов, различающихся по своему составу и свойствам. Биологическая функция всех типов ДНК не выяснена окончательно, хотя, по современным представлениям, она во всех случаях аналогична — обеспечение возможности самовоспроизведения клетки (или субклеточной частицы), хранение и перенос генетической информации и, наконец, обеспечение синтеза РНК, участвующей далее в синтезе белков в клетке.

III. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ РНК. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ РНК

Подобно ДНК, РНК является необходимым компонентом всех живых клеток. Она входит, кроме того, в состав всех исследованных вирусов растений, а также ряда бактериофагов, многих вирусов насекомых и животных. В то время как биологические функции ДНК разных типов, по-видимому, сходны, разные типы РНК имеют различные биологические функции. Функции вирусной РНК, по-видимому, аналогичны вирусной ДНК, т. е. этот тип РНК содержит генетическую информацию, необходимую для построения вирусной частицы, передает ее из поколения в поколение и, кроме того, обеспечивает синтез необходимых для построения вирусных частиц ферментов и белков вирусной оболочки. Как хорошо известно, в живой клетке различают по крайней мере три типа РНК, отли-

чающиеся по своей биологической функции. Во-первых, это рибосомальная РНК, входящая в состав структуры субклеточных частиц, в которых происходит синтез белка. Далее, существует относительно низкомолекулярная РНК, которая способна соединяться с аминокислотами, причем образующиеся аминоацильные производные служат исходными веществами при биосинтезе белка; эта фракция РНК известна под названием транспортной РНК *. Наконец, показано существование так называемой «информационной РНК» **, последовательность нуклеотидов в которой определяет последовательность аминокислот в белке.

Методы выделения РНК (обзоры — см. [6, 8]), в общем, довольно близки к методам выделения ДНК. Экстракцию клеток или субклеточных частиц для получения РНК проводят обычно фенолом [92–95]; остаточный белок часто удаляют обработкой детергентом или смесью хлороформа с октиловым спиртом. Отделение ДНК от РНК происходит обычно на стадии экстракции, так как можно подобрать условия, в которых РНК переходит в водный слой, а ДНК остается в интерфазе. Часто применяют для этой цели фракционное осаждение, реже — обработку препарата ДНК-азой. Различные типы клеточной РНК могут быть разделены фракционным осаждением, центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [96, 97], методами хроматографии [30, 98, 99] и электрофореза в геле [100–103].

Поскольку РНК имеет обычно значительно меньший молекулярный вес, чем ДНК, проблема деградации за счет гидродинамических сдвигов при выделении препаратов здесь стоит значительно менее остро. Очень насущной зато является проблема ферментативной деградации РНК под действием внутриклеточных и вносимых в систему РНК-аз (например, с пальцев рук экспериментатора [104]). РНК-азы являются обычно весьма устойчивыми ферментами, не инактивирующимися при нагревании и обработке фенолом. В связи с этим при выделении РНК рекомендуется постоянно добавлять ингибиторы РНК-аз, например бентонит (алюмосиликат), поливинилсульфат или иодацетамид.

Основными оцениваемыми характеристиками РНК являются, как и в случае ДНК, молекулярный вес и нуклеотидный состав. Молекулярный вес РНК можно определить с помощью метода светорассеяния [105] или химически — определением концевых групп (см. стр. 44); чаще для этой цели пользуются ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы. Предложен ряд эмпирических уравнений, связывающих константу седиментации *** в определенных

* Иногда применяют термины «растворимая РНК» и «адапторная РНК».

** Иногда используют термин «мессенджер-РНК».

*** Для устранения влияния вторичной структуры предложено определять константу седиментации в диметилсульфоксиде [496] или в присутствии формальдегида [497].

условиях и молекулярный вес [105–107]; чаще всего применяется уравнение, выдвинутое [107] А. С. Спириным. Определение нуклеотидного состава РНК основано обычно на количественном анализе нуклеотидов, образующихся после расщепления полимера (см. стр. 58).

Во многих случаях для характеристики препарата РНК предпочитают использовать не значение молекулярного веса, а величину константы седиментации или электрофоретическую подвижность, которая хорошо коррелирует с константой седиментации [108].

РНК вирусов (обзоры — см. [109–112]). РНК вирусов выделяют обычно из очищенных вирусных частиц с помощью фенольного или детергентного метода (типичные методики — см. [113–116]). Как правило, нуклеиновые кислоты вирусов существуют в виде одноцепочечной молекулы с мол. весом $1-3 \cdot 10^6$, хотя известны примеры значительно более низкого молекулярного веса. Так РНК одной из разновидностей фага Q_β имеет мол. вес $\sim 2 \cdot 10^5$, что соответствует содержанию 550 остатков нуклеотидов [117]. Излюбленными объектами изучения являются РНК из вируса табачной мозаики и вируса желтой мозаики турнепса, полиовирусов животных и вирусов гриппа. Наконец, значительное число работ посвящено исследованию вирусов бактериофагов, таких, как f2, MS2, R17, M12, fr, Q_β и др. Нативность выделяемой вирусной РНК можно контролировать с помощью биохимического теста — по способности инфицировать организмы, являющиеся хозяином данного вируса.

Известна небольшая группа вирусов, РНК которых существует в виде двухцепочечного комплекса; при выделении РНК получают обычно несколько компонентов. К числу таких вирусов относятся реовирус [118], вирус опухолей ран растений [119] и вирус карликовой кустистости риса [120].

Двухцепочечный комплекс, построенный из исходной (+)-цепи вирусной РНК и комплементарной к ней (—)-цепи РНК, синтезирующейся в организме хозяина при вирусной инфекции, является промежуточным продуктом при воспроизведении вируса в клетке («репликативная форма»). Для такого комплекса характерна устойчивость к действию небольших концентраций РНК-азы, он может быть выделен и отделен от других форм РНК с помощью центрифугирования в градиенте плотности или хроматографии на МАК (см., например, [121]).

РНК рибосом (обзоры — см. [40, 122–125]). Большая часть РНК живой клетки сосредоточена в цитоплазме и локализована в рибонуклеопротеидных гранулах, называемых рибосомами. Эти гранулы могут находиться в цитоплазме в свободном состоянии: в клетках животных и растений они обычно связаны с мембранами эндоплазматической сети, образуя так называемый «шероховатый эндоплазматический ретикулум». Рибосомы могут быть препаративно выделены ультрацентрифугированием и использованы в качестве исходного объекта для получения рибосомальной РНК.

Предварительное выделение рибосом не является, однако, необходимым, так как рибосомальная РНК составляет до 85% всей РНК клетки и может быть легко отделена от других компонентов [126–128].

При хроматографировании на МАК или центрифугировании в градиенте сахарозы РНК рибосом может быть разделена на три компонента. Два из них, открытые раньше, получили название «тяжелого» и «легкого» компонентов; третий компонент, известный под названием «5S РНК», может быть легко отделен от основной массы рибосомальной РНК [129–130].

Тяжелый компонент рибосомальной РНК в препаратах, полученных из тканей животных и растений, имеет константу седиментации 28—32S; для РНК, полученной из рибосом бактерий, характерно значение константы седиментации 23S. Это соответствует молекулярному весу приблизительно $1{,}6 \cdot 10^6$ для РНК из животных и растений и $1{,}1 \cdot 10^6$ для РНК из бактерий.

Легкий компонент рибосомальной РНК имеет константу седиментации 16—18S, что отвечает мол. весу $\sim 5 \cdot 10^5$. Компонент 5S имеет молекулярный вес $\sim 40\,000$, что соответствует полинуклеотидной цепи из 120 остатков нуклеотидов.

Недавно установлено, что «тяжелый» компонент РНК рибосом из клеток млекопитающих является в действительности комплексом двух молекул РНК [485]. При обработке его агентами, разрушающими водородные связи, удается выделить помимо 28S РНК новый компонент с молекулярным весом, соответствующим цепи из 130 остатков нуклеотидов. Этот компонент РНК рибосом известен под названием «7S РНК» или «28SA РНК».

Транспортные РНК (тРНК) (обзоры — см. [131–133]). Этот вид РНК присутствует в цитоплазме клетки в свободном состоянии; количество его может достигать 10—15% от всей РНК клетки. Транспортная РНК обладает способностью взаимодействовать в присутствии соответствующих ферментов с аминоациладенилатами, образуя соответствующие аминоацил-тРНК, которые служат активированной формой аминокислот при белковом синтезе. Каждый вид тРНК способен связываться только с одной аминокислотой; соответственно этому число видов индивидуальных тРНК в клетке не должно быть меньше числа аминокислот. В действительности, однако, число видов индивидуальных тРНК еще больше, так как для многих аминокислот показана способность связываться с двумя и иногда даже пятью специфическими тРНК. Способность тРНК присоединять аминокислоту может быть легко количественно измерена; ферментативное аминоацилирование используется для очистки тРНК.

Отделение тРНК от других видов РНК может быть достигнуто с помощью фракционированного осаждения, гель-фильтрации и других хроматографических методов. Относительно низкомолеку-

лярный характер тРНК (мол. вес $\sim 3 \cdot 10^4$) позволяет осуществить эффективное фракционирование смеси тРНК (обзоры — см. [6, 8, 131, 134]). Для этого используют противоточное распределение [135–138] и различные хроматографические методы [139–145]. Разработаны также методы, основанные на различии в свойствах концевых групп тРНК и аминоацил-тРНК; применяют окисление концевого нуклеозидного остатка в тРНК действием $NaIO_4$ [146–149] или наращивание полипептидной цепи на остаток аминокислоты, входящий в состав аминоацил-тРНК [150, 151]. С помощью сочетания различных методов очистки некоторые виды тРНК удалось получить в индивидуальном состоянии *.

РНК клеточного ядра (обзоры — см. [153–156, 499]). Значительное количество РНК содержится в клеточном ядре, где она локализована главным образом в ядрышке. Для выделения РНК из клеточного ядра требуются особые методы, так как при обычных методах экстракции эта фракция РНК не переходит в раствор. Наиболее распространенным методом получения РНК из клеточных ядер является экстракция горячим фенолом. При этом, изменяя температуру экстракции, удается получить разные фракции ядерной РНК. Наблюдаемая картина довольно сложна, однако можно с уверенностью констатировать, что помимо рибосомальной РНК и тРНК в клеточном ядре присутствуют по крайней мере три вида РНК, отличающиеся по молекулярному весу и нуклеотидному составу от описанных выше типов.

Первый из них — это РНК, близкая по составу к рибосомальной РНК, но имеющая значительно более высокий молекулярный вес. Показано, что этот тип РНК является предшественником рибосомальной РНК (обзор — см. [157]) **. Общепризнанным является присутствие РНК с константами седиментации 45S и 32S; при исследовании ядерной РНК с помощью электрофореза в полиакриламидном геле было показано присутствие еще нескольких компонентов [158].

Другой тип РНК отличается от всех иных компонентов клеточной РНК характерным нуклеотидным составом, близким к составу ДНК клетки [159, 160]. Большая часть РНК этого типа имеет константу седиментации, близкую к константе седиментации легкого компонента рибосомальной РНК. Показано, однако, присутствие и значительно более высокополимерных фракций РНК аналогичного состава (с константой седиментации 40—60S и больше) [161–163].

---

* Недавно предложен общий метод очистки тРНК, основанный на ацилировании аминогруппы в аминоацил-тРНК производным ароматической кислоты с сильно гидрофобными свойствами и последующем хроматографическом отделении таких ациламиноацил-тРНК от других тРНК [152].

** Недавно в цитоплазме клеток HeLa показано присутствие низкомолекулярной РНК — предшественника тРНК [493].

Наконец, из хромосом была получена низкомолекулярная РНК (молекулярный вес отвечает содержанию приблизительно 40 остатков нуклеотидов), характеризующаяся совершенно необычным нуклеотидным составом [164-166]. О различных низкомолекулярных ядерных РНК см. также [486-491].

Информационная РНК цитоплазмы (обзоры — см. [154, 156, 167-169]). Общепринятая схема биосинтеза белка требует присутствия в цитоплазме живой клетки особого вида РНК, нуклеотидная последовательность которой определяет аминокислотную последовательность синтезируемого белка. Справедливость этой схемы была подтверждена получением в бесклеточной системе белкового синтеза полипептидов определенной аминокислотной последовательности в присутствии синтетических полинуклеотидов (см. стр. 83) и специфических вирусных белков в присутствии РНК вирусов. Однако до сих пор из нормальной клетки не удалось получить в индивидуальном состоянии РНК, которая была бы способна вызывать синтез определенного белка при взаимодействии с рибосомами и аминоацил-тРНК.

Описаны многочисленные случаи обнаружения в клетках фракций РНК, которые отличаются высокой скоростью биосинтеза и более или менее близки по нуклеотидному составу к ДНК соответствующих клеток. Эти фракции способны вызывать включение радиоактивных аминокислот в белок в присутствии бесклеточной системы биосинтеза белка. На основании совокупности этих данных считается возможным рассматривать их как информационные РНК.

Выделение информационных РНК в значительной степени осложняется их гетерогенностью (из-за обилия типов белков, синтезируемых в клетке) и относительно высокой скоростью распада по сравнению с другими типами РНК. При выделении РНК зачастую происходит существенная деградация информационных РНК; это находит свое отражение в разноречивости данных о молекулярном весе этого типа РНК. Разные авторы приводят значения констант седиментации 6—14S, 18S и до 35—40S для информационных РНК из близких природных объектов.

Трудности выделения информационных РНК могут быть в значительной степени преодолены использованием клеток животных, специализированных на выработке одного белка. Так, из ретикулоцитов кроликов была выделена фракция РНК с константой седиментации 9S, которая по своему молекулярному весу соответствует информационной РНК для синтеза глобина (обзор — см.[170]), однако прямого экспериментального подтверждения ее биологической роли получить не удалось.

Прочие виды РНК. Присутствие РНК обнаружено во всех исследованных субклеточных частицах.

Внутриклеточные мембраны содержат РНК, отличающуюся по своему составу и константе седиментации от рибосомальной РНК [171–174].

Как уже отмечалось выше, митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК и в значительной степени независимы от клеточного ядра при переносе генетической информации. Внутри этих субклеточных частиц происходит синтез белка; естественно предполагать, что в них присутствуют рибосомальная, транспортная и информационная РНК. Это предположение подтвердилось, причем было показано, что рибосомальная РНК из митохондрий *Neurospora crassa* [175–177], а также тРНК из того же источника [178, 179] и тРНК из печени крыс [180] заметно отличаются от соответствующих цитоплазматических РНК. Аналогичная ситуация имеет место для рибосомальной РНК из хлоропластов *Euglena gracilis* [181], которая по константе седиментации неотличима от бактериальных рибосомальных РНК, но заметно отличается от рибосомальной РНК, встречающейся в цитоплазме этих водорослей.

Недавно появилось сообщение об обнаружении РНК в клеточной стенке высших растений [182].

IV. СТРУКТУРА ПОЛИНУКЛЕОТИДНОЙ ЦЕПИ*

Как видно из материала двух предыдущих разделов, выделение индивидуальных нуклеиновых кислот в интактном состоянии является довольно сложной проблемой, которая и по сей день разрешена удовлетворительно только для низкомолекулярных РНК (таких, как тРНК, 5S РНК, и, возможно, других компонентов рибосомальной РНК), а также РНК и ДНК из вирусов. Естественно, что речь о полном определении химической структуры может идти только для этих соединений.

Однако правильное понимание основного принципа построения нуклеиновых кислот и способа соединения мономерных единиц между собой (см. формулу V) было достигнуто уже в начале пятидесятых годов, когда исследователи имели в своем распоряжении весьма деградированные препараты нуклеиновых кислот.

Присутствие фосфодиэфирной связи в нуклеиновых кислотах как основного типа межмономерной связи было установлено на основании результатов потенциометрического титрования [184]. Структура V (R=H) для ДНК [185] — единственный возможный тип структуры, согласующийся с выделением дезоксинуклеозид-5′-фосфатов VII при ферментативном гидролизе ДНК (под действием фосфодиэстеразы кишечника [186]) и 3′,5′-дифосфатов пиримидиновых

* Обзор — см. [183].

дезоксинуклеозидов VIII при кислотном гидролизе ДНК[187].

$H_2O_3POCH_2$ O B, HO — VII

$H_2O_3POCH_2$ O B, H_2O_3PO — VIII

$H_2O_3POCH_2$ O B, HO OH — IX

B—остаток основания

В случае РНК участие 5′-гидроксильной группы остатка рибозы в образовании фосфодиэфирной связи доказано образованием рибонуклеозид-5′-фосфатов IX с почти количественным выходом при расщеплении РНК фосфодиэстеразой змеиного яда[188].

При щелочном гидролизе РНК образуется смесь нуклеозид-2′-фосфатов X и нуклеозид-3′-фосфатов XI *, что согласуется как со структурой V (R=OH) для РНК, так и с изомерной ей структурой, содержащей 2′—5′-фосфодиэфирные связи, и с любой структурой, в которой 2′—5′- и 3′—5′-фосфодиэфирные связи чередуются в произвольном порядке. Исследование механизма щелочного гидролиза РНК показало[185], что этот результат объясняется участием гидроксильной группы при С-2′ остатка рибозы в процессе расщепления фосфодиэфирной связи и промежуточным образованием нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов XII, которые расщепляются далее с образованием смеси X и XI (более подробно — см. гл. 10).

$HOCH_2$ O B, HO OPO_3H_2 — X

$HOCH_2$ O B, H_2O_3PO OH — XI

$HOCH_2$ O B, O O P HO O — XII

B—остаток основания

Выбор между двумя типами (2′—5′- или 3′—5′-) фосфодиэфирных связей и определение истинной природы межнуклеотидной связи в РНК были сделаны на основании изучения данных ферментативного гидролиза. Действие панкреатической рибонуклеазы на РНК приводит к пиримидиновым нуклеозид-3′-фосфатам и олигонуклеотидам, оканчивающимся остатком нуклеозид-3′-фосфата. Исследование действия этого фермента на синтетические модельные соединения показало, что алкильные эфиры пиримидино-

* Для обозначения этой смеси часто употребляют термин «нуклеозид-2′(3′)-фосфаты».

вых нуклеозид-3′-фосфатов легко расщепляются до нуклеозид-3′-фосфатов XI, а соответствующие производные нуклеозид-2′-фосфатов не затрагиваются ферментом. Следовательно, в РНК — природном субстрате панкреатической рибонуклеазы — также существует 3′—5′-фосфодиэфирная связь [189]. Такой вывод был подтвержден далее выделением нуклеозид-3′-фосфатов при расщеплении РНК под действием фосфодиэстеразы селезенки, причем при этой реакции промежуточного образования циклического фосфата XII не происходит и миграция фосфорильной группы исключена [190, 191].

Правильность структуры V для ДНК и РНК, предложенной впервые Тоддом и Брауном [185], подтверждается и более новыми данными, в частности идентичностью синтетических олигонуклеотидов с 3′—5′-фосфодиэфирными связями и продуктов расщепления нуклеиновых кислот.

Поскольку мономерные единицы в полинуклеотидной цепи соединены однотипно, часто для обозначения структуры полинуклеотидной цепи применяются сокращенные формулы, а именно:

B^1 B^2 B^i B^n —OH p p p ... p ...

$B^1 \ldots B^i \ldots B^n$—остатки оснований

В этих формулах остаток сахара изображается вертикальной прямой линией, а символ «p», как обычно, обозначает фосфомоно- или фосфодиэфирные группировки. Такие сокращенные формулы иногда используют и для продуктов расщепления нуклеиновых кислот; например, сокращенные формулы VIIa—XIIa соответствуют соединениям со структурой VII—XII.

VIIa VIIIa IXa Xa XIa XIIa

B—остаток основания

Подобные же принципы положены в основу сокращений для полинуклеотидов [192], рекомендованных комиссией по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии и Международного биохимического союза.

Доказательство основного принципа построения нуклеиновых кислот было получено при использовании сильно деградированных препаратов РНК и ДНК, и, строго говоря, нельзя утверждать, что нативные нуклеиновые кислоты состоят из единой полинуклеотидной цепи, а не из более или менее длинных полинуклеотидных участков, соединенных связями каких-либо иных типов.

Последнее предположение кажется, однако, весьма маловероятным на основании биогенетических соображений. В настоящее время удалось очистить ферменты, катализирующие образование из нуклеозид-5′-трифосфатов как рибо-, так и дезоксирибополинуклеотидных цепей, в которых остатки нуклеотидов соединены 3′—5′-фосфодиэфирными связями. С помощью таких ферментов удалось получить *in vitro* биологически активные РНК фага Q_{β}[193] и ДНК бактериофага ФХ174[194]. Этот результат показывает, что даже полинуклеотиды с молекулярным весом в несколько миллионов не содержат в своей структуре каких-либо иных типов связей, кроме фосфодиэфирных. Из авторадиографических данных о воспроизведении ДНК *Escherichia coli* вытекает, что вся эта огромная молекула построена по единому плану и не содержит аномальных связей[44].

Сложнее обстоит дело с нативными ДНК из клеток высших растений и животных. Были высказаны предположения, что нативная молекула ДНК в этом случае построена из субъединиц — полинуклеотидных цепей, соединенных между собой участками полипептидов или аминокислотами. В качестве возможного типа связи указывалась сложноэфирная связь между карбоксилом аминокислоты и 3′-гидроксильной группой остатка нуклеозида и, с другой стороны, фосфоэфирная связь между остатком нуклеозид-5′-фосфата и гидроксильной группой остатка оксиаминокислоты[195] или фосфоамидная связь с аминогруппой остатка аминокислоты[196]. Однако прямые экспериментальные доказательства, подтверждающие подобные предположения, отсутствуют.

V. КОНЦЕВЫЕ ГРУППЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДНОЙ ЦЕПИ

Концевые остатки нуклеозидов в полинуклеотидной цепи* могут иметь свободные или фосфорилированные 3′- или 5′-гидр-

* Концевой остаток нуклеозида (или нуклеотида), связанный с полимерной цепью только через гидроксильную группу при С-5′, принято называть 3′-концевым остатком полинуклеотидной цепи. Аналогично 5′-концевым остатком называется остаток нуклеозида (или нуклеотида), связанный с цепью полимера только через гидроксильную группу при С-3′. При обычном способе написания сокращенных формул полинуклеотидов (для одноцепочечных полимеров) 3′-концевой остаток находится на формуле справа, а 5′-концевой — слева.

оксильные группы; в соответствии с этим возможны четыре типа структуры нуклеиновых кислот, изображенные на формулах XIII—XVI:

pNpNp·····NpN (XIII) NpNp····NpNp (XIV)

pNpNp·····NpNp (XV) NpNp····NpN (XVI)

Определение природы концевых групп полинуклеотида и идентификация концевого остатка нуклеозида — одна из первых задач, которые встают при установлении структуры нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов. Эта задача может быть решена идентификацией характерных фрагментов в продуктах полного расщепления полинуклеотида или специфической меткой концевых остатков нуклеозида.

При расщеплении полинуклеотидной цепи с разрывом связей Р—О (О при С-5′) (такое расщепление может быть выполнено ферментативным гидролизом с помощью фосфодиэстеразы *Lactobacillus acidophilis* или селезенки телят, а в случае РНК — также при действии щелочи) образуются следующие характерные фрагменты: нуклеозид, если 3′-концевой остаток полинуклеотидной цепи свободен, и нуклеозид-3′,5′-дифосфат, если 5′-концевой остаток фосфорилирован (в случае щелочного гидролиза — нуклеозид-2′(3′),5′-дифосфат).

B^1 B^2 … B^{n-1} B^n —OH → B^1 (p, p) + (n−2) B^i (HO, p) + B^n (HO, —OH)

B^1…. B^i…. B^n—остатки оснований

При расщеплении же с разрывом связей Р—О (О при С-3′) (с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда) аналогичные фрагменты образуются из 3′-концевого фосфорилированного остатка нуклеотида и 5′-концевого остатка нуклеозида со свободной гидроксильной группой:

HO— B^1 B^2 B^3 … B^{n-2} B^{n-1} B^n → B^1 (HO—, —OH) + (n−2) B^i (p—, —OH) + B^n (p—, p)

B^1…. B^n—остатки оснований

Казалось бы, что с помощью уже одного из рассмотренных расщеплений можно надежно идентифицировать структуру типа XIII или XIV и определить оба концевых остатка нуклеозида

полимерной цепи; в случае же полимеров типа XV или XVI эта задача может быть решена сочетанием двух типов расщепления.

Практически, однако, дело обстоит несколько сложнее. Расщепление полинуклеотидов с концевой фосфатной группой гладко протекает лишь при использовании химических методов деградации, при расщеплении же под действием ферментов существенным условием быстрого протекания реакции является отсутствие фосфатной группы на 3′-конце полинуклеотидной цепи в случае фосфодиэстеразы змеиного яда и на 5′-конце — в случае фосфодиэстеразы селезенки (см. стр. 67). По этой причине перед ферментативным расщеплением необходимо удаление концевых фосфатных групп действием фосфомоноэстеразы, что приводит к исчезновению специфического фрагмента, образующегося из фосфорилированного конца цепи.

Значительные методические трудности создаются при определении специфических продуктов гидролиза, образующихся из концевых групп полинуклеотидной цепи, в присутствии большого избытка продуктов, возникающих из центральных звеньев цепи. Это особенно существенно для нуклеиновых кислот с высоким значением молекулярного веса. Существенное повышение чувствительности определения концевых групп достигается введением радиоактивной метки. Для этой цели могут быть использованы химические или ферментативные методы.

Концевая фосфатная группа полинуклеотидной цепи может быть превращена в фосфоанилид взаимодействием с ^{14}C-анилином и дициклогексилкарбодиимидом [197]; более общий метод состоит в превращении концевого остатка нуклеотида в двузамещенный пирофосфат [198] при реакции с ^{14}C-метилфосфоморфолидом.

B–остаток основания

Такие производные могут быть получены из 5′-концевого остатка нуклеотида в РНК и из 3′- и 5′-концевых остатков нуклеотида в ДНК (см. гл. 10); после расщепления полимера действием щелочи или ферментов соответствующие производные могут быть легко идентифицированы.

Для введения радиоактивной метки по 3′-концевому остатку нуклеозида в РНК используют способность вицинальной диольной группировки окисляться периодатом и взаимодействие образующегося диальдегида с такими реагентами, как ^{35}S-тиосемикарбазид[199], ^{14}C-семикарбазид[200], ^{3}H-гидразид изоникотиновой кислоты[201] или ^{3}H-боргидрид натрия[202].

B^n—остаток основания

Свободные гидроксильные группы на 3′- или 5′-конце цепи дезоксирибополинуклеотида могут быть подвергнуты ацетилированию меченым уксусным ангидридом[203], образующиеся ацетаты устойчивы в условиях ферментативного гидролиза.

Наконец, для специфического введения метки по 5′-концевой гидроксильной группе в ДНК можно использовать специфическую ферментативную реакцию — фосфорилирование под действием ^{32}P-аденозин-5′-трифосфата[204–206]. Эта реакция катализируется ферментом полинуклеотидкиназой из *Escherichia coli*, инфицированной фагами Т2 или Т4. В том случае, если полимер оканчивается остатком нуклеозид-5′-фосфата, концевая фосфатная группа может быть удалена обработкой фосфомоноэстеразой.

С биогенетической точки зрения наиболее вероятным типом структуры полинуклеотидной цепи является структура XIII, поскольку показано, что и рибо-, и дезоксирибополинуклеотиды образуются путем ферментативной полимеризации соответствующих нуклеозид-5′-трифосфатов. Такой тип структуры действительно был обнаружен во многих случаях — в транспортных РНК, 5S РНК, в других компонентах рибосомальной РНК, в некоторых РНК вирусов. РНК ряда вирусов имеют на 5′-конце цепи остаток нуклеозид-5′-трифосфата [207–210] или нуклеозид-5′-дифосфата [504].

Для многих ДНК относительно низкого молекулярного веса характерна циклическая форма, схематически представленная формулой XVII:

```
┌─NpNp······NpN─┐
│               │
└───────p───────┘
       XVII
```

Подобные ковалентно-связанные циклические структуры ДНК * были доказаны для ДНК фага ФХ174 и соответствующей репликативной формы ДНК, ДНК вирусов полиомы, папилломы, простого герпеса, вируса SV40, репликативных форм ДНК ряда других вирусов, ДНК митохондрий (обзоры — см. [16, 26, 78]). Для ДНК митохондрий было показано электронно-микроскопически, что кольцевые молекулы могут соединяться между собой как звенья в цепи, образуя димеры, тримеры и тетрамеры, аналогичные катенанам [211–213].



Существование молекул ДНК в циклической форме было впервые обнаружено при электронно-микроскопических исследованиях. Ковалентный характер связи в упомянутых выше соединениях доказывается неспособностью их подвергаться гидролизу под действием экзонуклеаз (см. стр. 67) даже в присутствии фосфомоноэстеразы. Появление единичных разрывов в полинуклеотидной цепи циклических ДНК под действием эндодезоксирибонуклеаз приводит к характерным изменениям конформации молекул (см. гл. 4), которые могут быть обнаружены по изменению коэффициента седиментации, вязкости и при наблюдении под электронным микроскопом, причем измеренная длина молекул, а следовательно, и молекулярный вес при этом не изменяются.

* В биологической литературе не всегда приводится четкое различие между ковалентно-связанными циклическими ДНК (XVII) и линейными молекулами ДНК, которые могут принимать циклическую конформацию за счет нековалентного взаимодействия между концами полинуклеотидной цепи (см., например, LIII на стр. 62).

Циклическая структура ДНК фага ФХ174 подтверждена полным ферментативным синтезом; получение биологически активной ДНК стало возможным лишь после открытия фермента, катализирующего циклизацию линейных полинуклеотидных цепей.

Возможно, что циклические структуры ДНК распространены еще более широко. Авторадиографические и генетические данные указывают, например, на циклическую структуру интактной ДНК бактерий[44]. Присутствие кольцевых ДНК было обнаружено с помощью метода электронной микроскопии и в препаратах ДНК из высших животных и растений[214], однако доказательства ковалентного характера циклизующей связи в них не проведено.

VI. СТРОЕНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты отличаются от других биополимеров относительно малым разнообразием мономерных единиц, входящих в их состав. Принято разделять мономерные единицы нуклеиновых кислот на основные компоненты и редкие (минорные) компоненты. Под основными компонентами нуклеиновых кислот понимают мономерные единицы, имеющие универсальное распространение и входящие в состав полимеров в значительных количествах (не менее 5%). Содержание редких компонентов заметно меньше (как правило, не более 2%); они встречаются далеко не во всех нуклеиновых кислотах. Обычно редкие компоненты можно рассматривать как производные основных компонентов, образующиеся из них при довольно простых химических реакциях (таких, как алкилирование, гидрирование и т. д.).

Классификация компонентов нуклеиновых кислот по их распространенности имеет под собой и биогенетическую основу. В то время как основные компоненты нуклеиновых кислот синтезируются в виде мононуклеотидов, которые затем превращаются в нуклеозид-5'-трифосфаты и подвергаются полимеризации с образованием нуклеиновых кислот, редкие компоненты обычно образуются из основных уже в составе полимера. При этом остаток нуклеозида в определенном месте полинуклеотидной цепи подвергается специфическому метилированию, гидрированию и т. д., в результате чего возникает остаток редкого компонента.

1. Основные компоненты РНК

Как уже отмечалось выше (см. стр. 25), в состав РНК входят остатки четырех нуклеозидов: аденозина Ia, гуанозина IIa, цитидина IIIa и уридина IVa. Эти соединения были впервые выделены из РНК дрожжей еще в начале нашего века; в дальнейшем было показано, что они входят в состав всех исследованных видов РНК.

С помощью классических методов органической химии было показано, что **аденозин** является 9-(β-*D*-рибофуранозил)-6-аминопу-

рином, а гуанозин — 9-(β-*D*-рибофуранозил)-2-аминодигидропуриноном-6; пиримидиновые же нуклеозиды — цитидин и уридин — представляют собой соответственно 1-(β-*D*-рибофуранозил)-4-аминодигидропиримидинон-2 и 1-(β-*D*-рибофуранозил)-тетрагидропиримидиндион-2,4*. Структура нуклеозидов была подтверждена химическим синтезом и результатами рентгеноструктурного исследования **.

Ia

IIa

IIIa

IVa

2. Редкие (минорные) компоненты РНК

Развитие хроматографических методов анализа нуклеотидного состава РНК позволило обнаружить, что многие препараты РНК содержат довольно богатый набор различных нуклеозидов — редких компонентов, которые можно рассматривать как производные основных компонентов. В настоящее время известно свыше 20 соединений такого рода (обзор — см. [218]). Особенно богата редкими компонентами тРНК, однако они найдены также в составе тяжелого и легкого компонентов рибосомальной РНК, а также в хромосомной РНК.

* Наряду с принятой в этой книге нумерацией атомов пиримидинового кольца в нуклеозидах (по «Chemical Abstracts») в литературе встречается и другая система нумерации, по которой уридин и цитидин обозначаются как 3-(β-*D*-рибофуранозил)-тетрагидропиримидиндион-2,6 и 3-(β-*D*-рибофуранозил)-6-аминодигидропиримидинон-2 соответственно.

** Данные об установлении строения обычных нуклеозидов и нуклеотидов суммированы в многочисленных монографиях, см. например [215–217].

Наиболее общим методом выделения редких компонентов РНК является, по-видимому, метод, предложенный Холлом[219]. Он состоит в ферментативном расщеплении РНК до нуклеозидов под действием смеси фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфомоноэстеразы из *Escherichia coli*. Смесь нуклеозидов разделяют далее с помощью распределительной хроматографии на целите. Мягкость условий расщепления полимера сочетается здесь с высокой эффективностью разделения мономеров, что и позволило обнаружить целый ряд неизвестных ранее редких компонентов РНК.

В настоящее время известно десять редких компонентов РНК, которые можно рассматривать как аналоги или производные уридина. К их числу относятся рибонуклеозидный аналог тимидина — 5-метилуридин (риботимидин)[220] XVIII, другой продукт метилирования уридина — 3-N-метилуридин XIX[221], сернистый аналог уридина — 4-тиоуридин XX[222], 5,6-дигидроуридин XXI[223] и 5-оксиуридин XXII[224].

XVIII XIX XX

XXI XXII

5-Метилуридин и 5-оксиуридин были впервые обнаружены при анализе суммарных препаратов РНК из печени крыс и из дрожжей, 3-N-метилуридин и 5,6-дигидроуридин выделены из тРНК дрожжей. Очень большое количество 5,6-дигидроуридина (до 25%) входит в состав хромосомной РНК из проростков гороха[164, 166]. В хромосомной РНК из асцитной опухоли крыс обнаружен 5-метил-5,6-дигидроуридин[492]. 4-Тиоуридин входит в состав тРНК из *E. coli*. Относительно недавно появились сообщения об обнаружении метилового эфира 5-карбоксиметилуридина XXIII

($R=CH_3OCOCH_2$)[225] в тРНК зародышей пшеницы, 5-оксиметилуридина XXIII ($R=HOCH_2$)[226] в тРНК клеток культуры тканей *L* и о выделении метилового эфира 5-карбоксиметил-2-тиоуридина XXIV ($R=CH_3OCOCH_2$)[227] из тРНК дрожжей. Из тРНК *E. coli* выделен 5-метиламинометил-2-тиоуридин XXIV ($R=CH_3NHCH_2$)[228, 229].

XXIII

XXIV

Помимо этих компонентов с N-гликозидной связью в состав тРНК входит в довольно значительных количествах необычный нуклеозид с С-гликозидной связью — так называемый псевдоуридин — 5-(β-*D*-рибофуранозил)-урацил XXV[230]; он найден также в составе рибосомальной РНК.

XXV

На формуле изображена структура природного изомера псевдоуридина («псевдоуридина С»); при обработке кислотами и щелочами образуется смесь изомеров, которые были идентифицированы как 5-(α-*D*-рибофуранозил)-, 5-(β-*D*-рибопиранозил)- и 5-(α-*D*-рибопиранозил)-урацилы (см. гл. 11).

Структуры редких компонентов РНК производных цитидина отличаются значительно меньшим разнообразием, чем в случае производных уридина. Здесь прежде всего характерны различные метилированные цитидины, выделенные из тРНК дрожжей, причем метильная группа может находиться у углеродного атома, как в 5-метилцитидине XXVI[231], у азота гетероциклического ядра, как в 3-N-метилцитидине XXVII[221], или у азота экзоциклической аминогруппы, как в 4-*экзо*-N-метилцитидине XXVIII[232]. В тРНК, выделенной из *E. coli*, обнаружен 2-тиоцитидин[229]. Описано выделение

из тРНК 5-оксиметилцитидина XXIX[231], а также 3-N-алкилцитидина, в котором алкильная группа отличается от метила[233]. При определении структуры сериновых тРНК дрожжей обнаружен в качестве редкого компонента[234] 4-*экзо*-N-ацетилцитидин XXX.

XXVI XXVII XXVIII

XXIX XXX

После щелочного гидролиза суммарной РНК дрожжей удается выделить небольшое количество нуклеотидов — производных 1-(α-*D*-рибофуранозил)-цитозина (α-цитидина)[235]. Неясно еще, однако, является ли этот нуклеозид природным компонентом РНК.

Редкие компоненты РНК — производные аденозина представлены прежде всего различными метилированными производными: 1-метиладенозином XXXI[236], 2-метиладенозином XXXII[220], 6-*экзо*-N-метил- и 6-*экзо*-N,N-диметиладенозинами XXXIII (R = H или CH_3)[220].

XXXI XXXII XXXIII

В состав тРНК также входит остаток продукта дезаминирования аденозина — инозин XXXIV и его 1-N-метильное производное XXXV [237].

XXXIV

XXXV

Показано присутствие в тРНК продуктов алкилирования аденозина по 6-*экзо*-N-атому, содержащих изопреноидные цепи. В тРНК из дрожжей, высших растений и млекопитающих обнаружен 6-*экзо*-N-(γ,γ-диметилаллил)-аденозин (6-*экзо*-N-изопентениладенозин) XXXVI [238, 239], а в тРНК из растений — 6-*экзо*-N-(*цис*-4″-окси-3″-метил-бутен-2″-ил-1″)-аденозин XXXVII [240]. В тРНК из *E. coli* найден 2-метилтио-6-*экзо*-N-(γ,γ-диметилаллил)-аденозин XXXVIII [241].

XXXVI (R=R′=H)

XXXVII (R=OH, R′=H)

XXXVIII (R=H, R′=SCH_3)

XXXIX

Сообщалось также [242, 243] о выделении различных 6-*экзо*-N-аминоациладенозинов. Однако недавно структура этих редких компонентов была пересмотрена. По новым данным [500], выделенное ранее производное аденозина является N-[9-(β-*D*-рибофуранозил)-пуринил-6-карбамоил]-треонином XXXIX.

В ряду редких компонентов РНК производных гуанозина известны различные продукты его метилирования: 1-метилгуанозин XL[244], 2-*экзо*-N-метилгуанозин XLI (R = H)[244], 2-*экзо*-N,N-диметилгуанозин XLI ($R=CH_3$)[249] и 7-метилгуанозин XLII[245].

XL

XLI

XLII

Многие редкие компоненты РНК являются, как видно из перечисления, продуктами биохимического метилирования основных компонентов по тем или иным атомам гетероциклического ядра и его заместителей. Такое метилирование может происходить и по гидроксильной группе остатка рибозы, на что указывает выделение

XLIII

B—остаток основания

2′-О-метилрибонуклеозидов XLIII из продуктов ферментативного гидролиза различных РНК, а также из устойчивых к действию

щелочи динуклеотидов. Были выделены метилированные по остатку рибозы производные аденозина[246, 247], гуанозина[247], цитидина[247], уридина[247], псевдоуридина[247] и 4-*экзо*-N-метилцитидина[248].

3. Основные компоненты ДНК

Как уже отмечалось выше, три из четырех основных компонентов ДНК — 2′-дезоксиаденозин Iб, 2′-дезоксигуанозин IIб и 2′-дезоксицитидин IIIб — аналогичны по строению соответствующим рибонуклеотидам, а четвертый основной компонент — тимидин IVб — отличается присутствием дополнительной метильной группы у С-5 пиримидинового кольца.

Iб IIб

IIIб IVб

Эти нуклеозиды, впервые идентифицированные в продуктах расщепления ДНК зобной железы телят, были в дальнейшем выделены из ДНК большинства других биологических объектов. Исключение составляют ДНК некоторых фагов, в состав которых входят необычные пиримидиновые компоненты.

Так, в ДНК Т-четных фагов (Т2, Т4 и Т6) 2′-дезоксицитидин полностью заменен на 5-оксиметил-2′-дезоксицитидин XLIVa[249], причем последний может входить в состав ДНК также в виде гликозидов по оксиметильной группе гетероциклического ядра[250, 251]. Были выделены производные α-*D*-глюкопиранозил- XLIVб, β-*D*-глюкопиранозил- XLIVв и α-(6-β-*D*-глюкопиранозил)-*D*-глюко-

пиранозил-5-оксиметил-2′-дезоксицитидина XLIVг (α-генциобиозил-5-оксиметил-2′-дезоксицитидина).

XLIV

где R следующие остатки:

а б в г

В ДНК фага SP8 тимидин замещен на 5-оксиметил-2′-дезоксиуридин XLV [252], а в ДНК фага PBS-1 — на 2′-дезоксиуридин XLVI [253].

XLV XLVI

4. Редкие компоненты ДНК*

В ДНК из различных источников обнаружено присутствие ряда редких компонентов — продуктов метилирования нормальных компонентов ДНК. Наиболее распространенным из них является 5-метил-2′-дезоксицитидин XLVII [255], который входит в значительных количествах в состав ДНК растений и в небольших количествах в ДНК млекопитающих, рыб и насекомых. В ДНК, выделенных из

* Обзор — см. [254].

ряда бактерий и вирусов, показано[256] присутствие остатков 6-*экзо*-N-метил-2′-дезоксиаденозина XLVIII. Недавно выяснено, что в ДНК встречаются и метилированные производные 2′-дезоксигуанозина[257]: 1-метил- XLIX, 2-*экзо*-N, N-диметил- L и 7-метилдезоксигуанозина LI.

XLVII XLVIII XLIX

L LI

VII. НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ И ОБНАРУЖЕНИЕ ИДЕНТИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПОЛИНУКЛЕОТИДАХ

Одной из важных характеристик различных типов нуклеиновых кислот является состав входящих в них компонентов. Результаты многочисленных анализов состава нуклеиновых кислот, проведенных в конце сороковых — начале пятидесятых годов, послужили решающим аргументом, позволившим отбросить старое представление о нуклеиновых кислотах как тетрануклеотидах или полимерах, содержащих повторяющиеся тетрануклеотидные последовательности. Эти данные подготовили почву для создания современных представлений о макромолекулярной структуре ДНК.

Употреблявшиеся ранее методы изучения состава нуклеиновых кислот были основаны на анализе продуктов, образующихся при кислотном гидролизе биополимеров. При жестком кислотном гидролизе (72%-ная хлорная кислота, 100° С или 85%-ная муравьиная кислота, 175° С) за счет расщепления N-гликозидных связей образуется смесь пуриновых и пиримидиновых оснований; в более мягких условиях (1 н. соляная кислота, 100° С) из РНК образуется смесь пуриновых оснований и пиримидиновых нуклеозид-2′(3′)-фос-

фатов. Эти смеси могут быть разделены с помощью хроматографии на бумаге, и их компоненты определены спектрофотометрически [258]. Широко используется также щелочной гидролиз РНК (0,5 н. KOH, 37° C), приводящий к образованию смеси нуклеозид-2′(3′)-фосфатов, которые могут быть разделены с помощью ионообменной хроматографии [259], электрофореза [260] и хроматографии на бумаге [261]. В последнее время для анализа продуктов расщепления нуклеиновых кислот широко используют тонкослойную хроматографию [262]. Довольно жесткие условия, применяемые для расщепления полинуклеотидов, могут приводить к некоторой деградации их компонентов; наиболее существенное значение имеют ошибки, связанные с частичным дезаминированием производных цитидина в производные уридина, происходящим в сильнокислой или щелочной среде [263]:

R — остаток рибозы или рибозофосфата

Значительно большей деградации могут подвергаться некоторые редкие компоненты нуклеиновых кислот. Дигидроуридин, например, разрушается в обычных условиях щелочного гидролиза РНК (см. стр. 456).

Вследствие этого в современных исследованиях предпочитают проводить анализ нуклеотидного состава с помощью ферментативного расщепления полимеров.

Для определения нуклеотидного состава ДНК использовались и исследования физических характеристик двухцепочечных комплексов. Показано, что существует хорошая корреляция между температурой плавления [27] или плавучей плотностью [28] таких комплексов и их нуклеотидным составом.

Результаты многочисленных анализов показывают, что за редким исключением в состав нуклеиновых кислот входят все четыре основных компонента, характерных для данного типа полинуклеотида, а содержание редких компонентов может меняться в значительных пределах. Для большей части образцов ДНК довольно строго соблюдается правило Чаргаффа [264] — эквивалентность содержания аденина и тимина, с одной стороны, и гуанина и цитозина (или цитозин + 5-метилцитозин) — с другой. Из этого правила чисто арифметически вытекают другие закономерности, известные под названием правил Чаргаффа: эквивалентность содержания пуринов и пиримидинов и эквивалентность содержания оснований с кетогруппой (гуанин + тимин) и с аминогруппой (аденин + цитозин). Напротив, отношение суммы гуанина и

цитозина к сумме аденина и тимина отличается от единицы и обычно не может быть выражено отношением целых чисел. Эту величину, характеризующую нуклеотидный состав данного полимера, принято называть коэффициентом специфичности. Часто для этой цели используют и процентное содержание суммы гуанина и цитозина в данной ДНК.

Смысл правила Чаргаффа для ДНК стал понятным после выдвижения Уотсоном и Криком своей модели структуры ДНК: эквивалентно содержание тех пар оснований, которые являются комплементарными при образовании двухцепочечного комплекса. Состав одноцепочечных ДНК, например ДНК фага ФХ174, не подчиняется правилам Чаргаффа.

Многочисленные анализы нуклеотидного состава ДНК из разных источников (обзоры — см. [265—267]) показывают, что, если у бактерий процентное содержание суммы гуанина и цитозина может меняться в значительной степени (например, для *Bacillus cereus* 37%, *Escherichia coli* 50%, *Mycobacterium phlei* 73%), у высших животных и растений эта величина составляет 40—49%. Внеядерные ДНК и ДНК-«спутник» могут иметь как большее, так и меньшее содержание суммы гуанина и цитозина, чем основной компонент ДНК клеточного ядра данного вида, но различия обычно невелики. Существенным исключением в этом отношении является ДНК-«спутник» из тканей некоторых видов крабов, которая содержит меньше 3% суммы гуанин + цитозин и является практически почти чистым сополимером дезоксиадениловой и тимидиловой кислот.

Состав двухцепочечных комплексов вирусной РНК также подчиняется правилу Чаргаффа для ДНК (с заменой тимина на урацил), РНК реовируса и вируса тканевой опухоли ран растений имеют соответственно 44 и 38% гуанина + цитозина. Для остальных видов РНК обычно не наблюдается эквивалентности между содержанием комплементарных оснований.

Анализ суммарных препаратов РНК (который, видимо, довольно близко отражает состав компонентов рибосомальных РНК) показывает, что, как правило, коэффициент специфичности больше единицы и довольно мало меняется от вида к виду даже у бактерий (обзор — см. [265]); состав рибосомальных РНК обычно существенно отличается от состава ДНК. Напротив, состав некоторых фракций ядерной РНК и информационной РНК цитоплазмы высших животных характеризуется значениями коэффициента специфичности меньше единицы и приближается, таким образом, к суммарному составу ДНК. Нуклеотидный состав препаратов суммарной РНК (а также состав тяжелого и легкого компонентов рибосомальной РНК) хорошо подчиняется правилу Чаргаффа для РНК [268]: отношение количества оснований с кетогруппой и оснований с аминогруппой близко к единице. Смысл этой закономерности для макромолекулярной структуры рибосомальной РНК остается

пока неясным. В последнее время удалось провести анализ нуклеотидного состава разных РНК внутри клеток одного и того же типа. Оказалось, что существуют небольшие, но вполне определенные различия между компонентами рибосомальной и ядерной РНК, как это показано в табл. 1.1 для полирибонуклеотидов из клеток культуры HeLa [499].

Таблица 1.1 **Нуклеотидный состав различных видов РНК из клеток HeLa [499]**

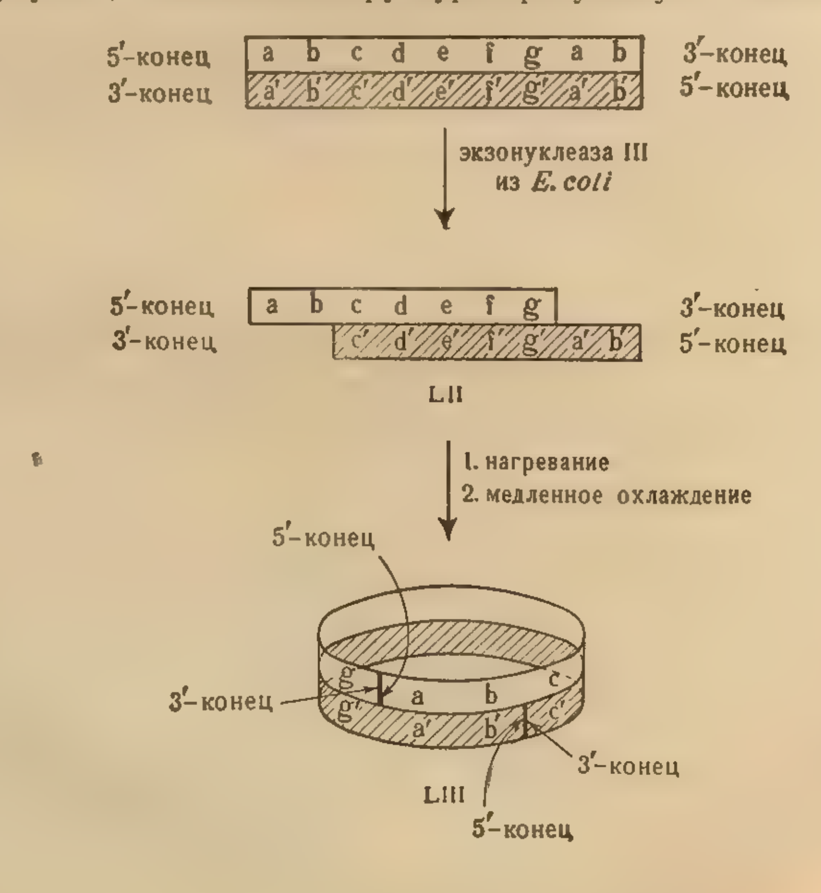
Вид РНК	Содержание РНК данного вида в клетке, %	Содержание оснований РНК, %				Коэффициент специфичности
		цитозин	аденин	гуанин	урацил	
РНК цитоплазмы:						
28S рРНК	53	32	16	36	16	2,1
18S рРНК	24	27	21	30	22	1,3
7S рРНК	1	28	21	28	23	1,3
5S рРНК	1	26	18	34	22	1,5
тРНК	12	27	22	27	24	1,2
иРНК	3	24	26	21	28	0,83
Прочие виды РНК	2	—	—	—	—	—
РНК клеточного ядра:						
45S РНК	1	33	13	37	17	2,3
32S РНК	3	33	14	37	16	2,3
ДНК-подобная РНК	—	22	26	21	31	0,75

Естественно, что одинаковый состав двух полинуклеотидов не означает даже при одинаковом молекулярном весе их идентичности в химическом смысле: они могут отличаться последовательностью нуклеотидов. Поскольку установление последовательности (см. следующий раздел) является сложной и не до конца разрешенной проблемой, были разработаны методы приближенной оценки соответствия различных полинуклеотидов по нуклеотидной последовательности. Эти методы широко применяются в биохимических исследованиях.

Первый метод, известный обычно под названием «гибридизация» [269], основан на следующем принципе. Если нагреть двухспиральный комплекс ДНК выше его температуры плавления и медленно охлаждать смесь полученных одноцепочечных полимеров в присутствии другого одноцепочечного полинуклеотида, наряду с восстановлением исходного комплекса происходит образование некоторого количества «гибридного» двухцепочечного комплекса, т. е. комплекса, в состав которого входят полинуклеотидные цепи, принадлежавшие ранее различным макромолекулам. Такой комплекс образуется тем в большей степени, чем больше в цепи добавленного полимера нуклеотидных последовательностей,

комплементарных соответствующим участкам одной из цепей исходной ДНК. «Гибридные комплексы» могут быть получены между двумя видами ДНК или между ДНК и РНК. Их образование может быть обнаружено, а количество их оценено с помощью равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности или по способности двухцепочечных комплексов задерживаться нитроцеллюлозными фильтрами. Наиболее удобным вариантом метода является, однако, использование для этой цели колонок с ДНК, «заключенной» в агар [270, 271]. Полинуклеотиды с мол. весом $0,5-1,0 \cdot 10^6$ задерживаются в такой колонке лишь за счет образования комплексов с ДНК. Количество задержанного на колонке полинуклеотида легко определить. С помощью такого варианта можно исследовать и способность различных полинуклеотидов конкурировать между собой за связывание с одной и той же ДНК; таким путем можно обнаружить присутствие общих нуклеотидных последовательностей в различных препаратах РНК.

По существу аналогичный принцип (принцип циклизации) используется для обнаружения так называемых «липких концов» двухцепочечных ДНК — взаимно комплементарных одноцепочечных концевых участков полинуклеотидной цепи (см. схематическую формулу LII). ДНК такой структуры присутствует в некоторых бак-



териофагах, например в фаге λ[272]. В других случаях, например для ДНК фага Т3, такие полинуклеотиды могут быть получены кратковременным ферментативным гидролизом нативной ДНК[273] — обработкой экзонуклеазой III из *Escherichia coli* (см. стр. 67).

Нагревание полинуклеотида LII при температуре несколько ниже температуры плавления и последующее медленное охлаждение приводит к образованию циклической структуры LIII за счет нековалентного взаимодействия комплементарных «липких концов». Такая структура может быть обнаружена с помощью электронной микроскопии. Этот прием был использован для доказательства того, что концевые участки полинуклеотидных цепей ДНК фагов Т3 и Т7 имеют одинаковую последовательность. Пользуясь сочетанием «гибридизации» и «циклизации», можно различить вирусные ДНК, содержащие уникальную последовательность нуклеотидов и представляющие набор циклически переставленных фрагментов[274] (см. стр. 32).

Другой метод идентификации полимеров, применимый к исследованию полимеров с близкой нуклеотидной последовательностью, — «анализ ближайших соседей»[275–277]. Применение его возможно в том случае, когда исследуемый полинуклеотид может быть получен из радиоактивных предшественников *.

В ферментативную полимеризацию вводят смесь нуклеозид-5′-трифосфатов (см. стр. 98), один из компонентов которой содержит радиоактивный фосфор. Образующийся полимер расщепляют далее до мононуклеотидов таким образом, что разрывается связь Р—О (О при С-5′); для этой цели в случае ДНК используется гидролиз смесью ДНК-азы микрококков и фосфодиэстеразы змеиного яда, в случае РНК — гидролиз щелочью. После такого расщепления радиоактивный фосфат оказывается в составе нуклеозид-3′-фосфата, остаток которого в полимерной цепи был соседним с остатком введенного меченого предшественника. Так, например, относительное содержание динуклеотидных последовательностей ApA, GpA, UpA и CpA можно определить, вводя в полимеризацию α-^{32}Р-аденозин-5′-трифосфат и измеряя радиоактивность соответствующих нуклеозид-3′-фосфатов после расщепления:

$$\begin{bmatrix} ppp\overset{*}{A} \\ pppG \\ pppU \\ pppC \end{bmatrix} \xrightarrow{\text{полимеризация}} \ldots Up^{*} | Ap^{*} | Ap | Up | Gp^{*} | Ap | Cp^{*} | Ap | Up^{*} | Ap \ldots$$

$$\downarrow \text{расщепление}$$

$$Ap^{*} + Up^{*} + Cp^{*} + Gp^{*} + Ap + Up + Cp + Gp$$

* Анализ ближайших соседей можно проводить и с помощью некоторых методов химического расщепления полинуклеотидов — подробнее см. 69.

Повторив анализ для всех входящих в полимер нуклеозид-5′-трифосфатов, можно определить содержание всех возможных сочетаний динуклеотидов в данном полимере; это позволяет обнаружить идентичность или неидентичность двух нуклеотидных последовательностей. Такой метод широко применяется для исследования полинуклеотидов, получаемых с помощью ферментов *in vitro*.

VIII. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДОВ В ПОЛИНУКЛЕОТИДНОЙ ЦЕПИ *

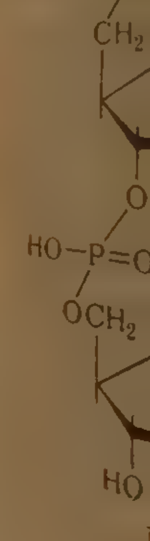
Для полного установления строения нуклеиновых кислот необходимо, помимо установления основного принципа построения полимера, выяснения структуры входящих в него компонентов и определения их количества в составе полимера, решить вопрос о последовательности мономерных единиц в полимерной цепи. Современные данные показывают, что полинуклеотидная цепь нуклеиновых кислот, за исключением ДНК-«спутника» из крабов [в основном поли-d(Ap Tp)] и, возможно, некоторых других ДНК-«спутников», не построена из повторяющихся звеньев. С другой стороны, как показывают результаты анализа ближайших соседей, распределение нуклеотидных единиц в цепи сильно отличается от среднестатистического. В специфической последовательности нуклеотидов в цепи ДНК содержится, по современным биохимическим представлениям, вся информация о последовательности аминокислот в белках данного организма.

Задача установления нуклеотидной последовательности является весьма сложной; практически она успешно решена пока лишь в случае относительно низкомолекулярных РНК, таких, как тРНК и 5S РНК. Имеющие в настоящее время практическое значение методы установления последовательности нуклеотидов в полинуклеотидной цепи основаны на частичном расщеплении полинуклеотидов. Поэтому перед рассмотрением основных принципов, с помощью которых производится установление строения полинуклеотидов, и применением этих принципов к различным типам природных нуклеиновых кислот целесообразно коротко остановиться на используемых методах избирательного расщепления полинуклеотидной цепи.

1. Частичное расщепление полинуклеотидов

Для решения этой задачи могут быть использованы два подхода: последовательное отщепление мономерных остатков с одного из концов полинуклеотидной цепи и расщепление полимера на

* Обзоры — см. [278–281, 501, 502].



блоки путем разрыва внутренних фосфодиэфирных связей. В обоих подходах могут быть использованы как химические, так и ферментативные методы; последние имеют пока более широкое распространение.

Химический метод последовательного отщепления нуклеозидных остатков с 3'-конца полирибонуклеотидной цепи[282, 283] основан на следующей схеме. Полинуклеотид LIV, содержащий на 3'-конце цепи единственную на весь полимер диольную группировку, обрабатывают периодатом; полученный диальдегид LV в мягких условиях избирательно расщепляется за счет β-элиминации с образованием полинуклеотида LVI, укороченного на одно звено. После ферментативного дефосфорилирования последнего образуется полинуклеотид LVII, идентичный по концевой углеводной группировке исходному LIV; этот новый укороченный нуклеотид может быть вновь подвергнут той же ступенчатой деградации. Разработано

B^{n-1}, B^{n}—остатки оснований

несколько удобных вариантов проведения ступенчатого отщепления нуклеозидов по этому методу [284–288], удалось подобрать мягкие условия проведения расщепления и разработать удобные методики для определения образующихся оснований.

Для отщепления 5′-концевого остатка ДНК предложен метод, основанный на каталитическом окислении первичной гидроксильной группы и последующей β-элиминации [289]:

B^1, B^2 — остатки оснований

Ступенчатое отщепление нуклеотидов с 3′-конца полидезоксирибонуклеотида может быть выполнено обработкой полимера смесью диметилсульфоксида и уксусного ангидрида [290]. При этом происходит окисление 3′-концевой гидроксильной группы до карбонильного соединения и β-элиминация.

Последовательное отщепление остатков нуклеотидов с концов полинуклеотидной цепи может быть осуществлено и при действии ферментов — экзонуклеаз (обзор — см. [4]), о которых уже упоминалось выше *. Некоторые сведения о наиболее широко применяемых ферментах такого рода приведены в табл. 1.2.

---

* Последовательное отщепление нуклеотидов может быть осуществлено также с помощью полинуклеотидфосфорилазы (см. стр. 98). Продуктами катализируемой этим ферментом реакции олигорибонуклеотида с фосфорной кислотой являются нуклеозид-5′-дифосфаты.

Таблица 1.2. **Действие ряда экзонуклеаз на полинуклеотиды**[4]

Фермент	Субстрат	Продукт реакции	Конец полинуклеотидной цепи, от которого происходит отщепление мононуклеотидов
Фосфодиэстераза змеиного яда	Одноцепочечный полинуклеотид со свободной 3′-OH-концевой группой	pN	3′-OH
Фосфодиэстеразы селезенки быка и *Lactobacillus acidophilis*	Одноцепочечный полинуклеотид со свободной 5′-OH-концевой группой	Np	5′-OH
Экзонуклеаза I из *Escherichia coli*	Одноцепочечный дезоксирибополинуклеотид со свободной 5′-OH-концевой группой	dNp	5′-OH
Экзонуклеаза III из *Escherichia coli*	Двухцепочечный комплекс дезоксирибополинуклеотида, цепи имеют 3′-OH-концевые группы	pdN	3′-OH (обе цепи)

Процесс ферментативного расщепления можно контролировать, анализируя отщепляющиеся мононуклеотиды в различные моменты времени; более удобным во многих случаях оказывается анализ состава недеградировавших фрагментов[291, 292]. Последний подход можно продемонстрировать на примере установления структуры октануклеотида LVIII, выделенного при частичном расщеплении аланиновой тРНК дрожжей (см. схему 1 на стр. 75, последовательность 41—47). После обработки этого октануклеотида фосфодиэстеразой змеиного яда выделены гептануклеотид LIX, гексануклеотид LX, пентануклеотид LXI и тетрануклеотид LXII:

GpGpGpApGpApGpU	LVIII
GpGpGpApGpApG	LIX
GpGpGpApGpA	LX
GpGpGpApG	LXI
GpGpGpA	LXII

Сравнение их нуклеотидного состава и состава исходного олигонуклеотида позволяет однозначно заключить, что 3′-конец цепи LVIII имеет структуру —GpApGpU. Структура тетрануклеотида LXII может быть в данном случае однозначно написана на основании результатов определения 3′-концевой группы (см. стр. 44), так

как единственным нуклеозидом, образующимся при щелочном гидролизе, является аденозин:

$$\underset{\text{LXII}}{\text{GpGpGpA}} \xrightarrow{OH^-} 3\text{Gp} + \text{A}$$

Как химические, так и ферментативные методы определения последовательности нуклеотидов поочередным отщеплением концевых мономеров полинуклеотидной цепи имеют свои ограничения: при химическом методе это связано с неколичественным протеканием процесса и частичным расщеплением псевдоуридина под действием периодата, при ферментативном — с отдельными разрывами фосфодиэфирных связей в середине полинуклеотидной цепи (за счет примесей других ферментов). Вследствие этого редко удается определить таким образом последовательности более 5—6 остатков нуклеотидов; метод, однако, широко применяется для анализа олигонуклеотидов, образующихся при частичном расщеплении цепи РНК.

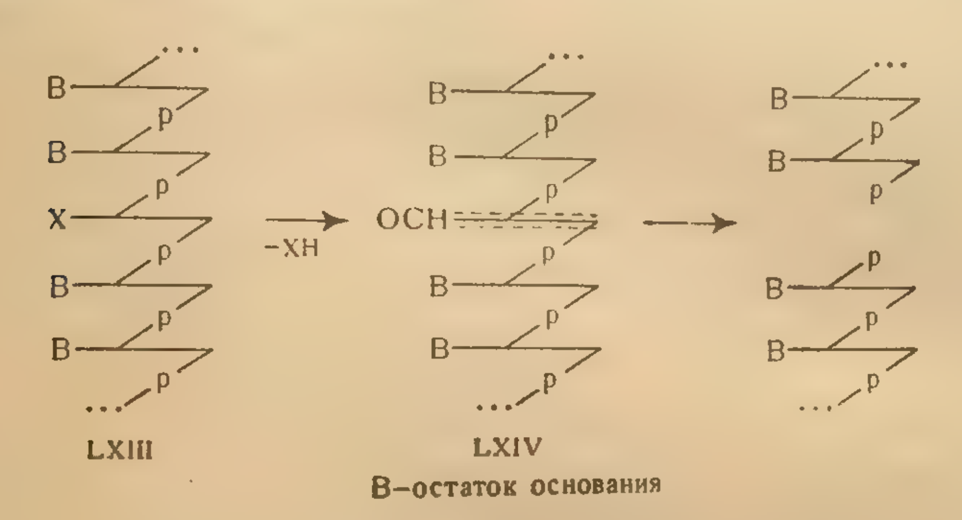
Как указывалось выше, другой принцип установления последовательности мономеров в полинуклеотидной цепи основан на расщеплении ее на более мелкие блоки; для этого необходимы методы расщепления цепи по месту определенных мономеров или их комбинаций. Химический метод такого расщепления основан на повышении лабильности фосфоэфирной связи в производных рибозо- или 2-дезоксирибозо-3-фосфата за счет перехода остатка сахара в альдегидную форму и последующей β-элиминации[293]:

OR′–CH₂ (фуранозный цикл, OH; 3′-O–P(=O)(OH)–OR″; R) ⇄ [OR′–CH₂, OH, CHO; O–P(=O)(OH)–OR″; R] ⟶ $R''O-P(=O)(OH)-OH + R'OH$

R = H или OH; R′ и R″ остатки моно- или полинуклеотидов

Для реализации этого в полинуклеотиде LXIII должны быть избирательно удалены некоторые типы оснований (обозначенные через X). Полученный таким образом полинуклеотид, содержащий остатки пентозо-3′5′-дифосфата (LXIV) со свободным гликозид-

ным центром рибозы, может в относительно мягких условиях претерпевать распад с расщеплением связи Р—О (О при С-3′), в результате которого образуются олигонуклеотиды, не содержащие нуклеозидов с основаниями X *.



B—остаток основания

Превращение ДНК в полинуклеотиды типа LXIV довольно хорошо разработано: при кислотном гидролизе может быть получена апуриновая ДНК[294, 295], при обработке гидразином — апиримидиновая ДНК[296], а при действии азотистой кислоты и гидроксиламина — ацитидиловая дезаминированная ДНК[297]. Недавно подобные превращения были осуществлены и для более лабильной РНК — при действии гидроксиламина удалось получить дезуридиловую РНК[298, 299].

Более подробное обсуждение получения полинуклеотидов типа LXIV и их расщепления — см. гл. 7, 10.

Для специфического ферментативного расщепления полинуклеотидной цепи используется действие эндонуклеаз. Наиболее широко этот прием применяется для РНК, так как известны два достаточно легко доступных фермента, обладающих ярко выраженной и хорошо охарактеризованной специфичностью, — пиримидил-РНК-аза (панкреатическая РНК-аза) и гуанил-РНК-азы (РНК-аза T_1 из такадиастазы; РНК-аза из актиномицетов). Пиримидил-РНК-аза катализирует расщепление фосфодиэфиров нуклеозидов, производных 2-кетопиримидинов, не имеющих заместителя при N-3. При этом получаются соответствующие нуклеозид-3′-фосфаты или их

* При жестком щелочном расщеплении полимера LXIV остаток нуклеозида, соседний с остатком расщепленного нуклеозида, превращается в нуклеозид-3′,5′-дифосфат pNp. Это можно использовать для анализа «ближайших соседей» (см. стр. 63).

производные; промежуточными продуктами являются нуклеозид-2′, 3′-циклофосфаты.

R и R′—остатки моно- или полинуклеотидов

Под действием пиримидил-РНК-азы расщепляются фосфодиэфирные связи, образованные производными уридина и цитидина, а также фосфодиэфиры некоторых редких компонентов РНК, в частности псевдоуридина, 5,6-дигидроуридина и риботимидина *. Вопрос о влиянии природы пиримидинового кольца нуклеозида на скорость реакции, катализируемой пиримидил-РНК-азой, рассмотрен в обзоре Витцеля[302] (см. также[303]). При расщеплении РНК под действием пиримидил-РНК-азы образуется смесь 3′-фосфатов пиримидиннуклеозидов и олигонуклеотидов, терминированных остатком пиримидин-3′-фосфата. Скорость ферментативной реакции сильно зависит от природы отщепляющегося остатка и конформации полинуклеотида (см. стр. 291); можно осуществить специфическое частичное расщепление полинуклеотидов в условиях, когда скорость процесса уменьшена.

Гуанилрибонуклеаза (РНК-аза T_1 из такадиастазы, обзор см.[304]) катализирует расщепление фосфодиэфиров нуклеозид-3′-фосфатов, производных 6-кетопурина, не замещенных по N-1 и N-7 (стр. 71).

К этой группе нуклеозидов из основных компонентов РНК относится гуанозин, из редких — инозин, 2-*экзо*-N-метилгуанозин и 2-*экзо*-N, N-диметилгуанозин. Продуктами реакции являются соответствующие нуклеозид-3′-фосфаты или олигонуклеотиды с концевым гуанозин-3′-фосфатом. Как и в случае пиримидил-РНК-азы,

---

* При тщательном исследовании на модельных соединениях было показано, что обычные препараты пиримидил-РНК-азы могут с очень малой скоростью расщеплять производные и пуриновых нуклеозидов[300]. Это связано, по-видимому, с присутствием в этих препаратах примесей РНК-аз другой специфичности (см.[301]). При структурных исследованиях, однако, этой побочной реакцией можно пренебречь.

с помощью гуанил-РНК-аз можно осуществить специфическое расщепление полинуклеотидов.

R и R′—остатки моно- или полинуклеотидов

Близкой специфичностью обладает РНК-аза, выделенная из актиномицетов [305]; наряду с перечисленными выше типами нуклеотидов она катализирует также расщепление производных 1-N-метилгуанозин-3′-фосфата.

Промежуточными продуктами при расщеплении фосфодиэфирных связей под действием гуанил-РНК-азы, так же как и пиримидил-РНК-азы, являются циклические нуклеозид-2′,3′-фосфаты, которые переходят затем в нуклеозид-3′-фосфаты. В некоторых случаях эта вторая стадия реакции протекает очень медленно и циклические фосфаты накапливаются в значительных количествах.

Помимо рассмотренных выше эндонуклеаз известен целый ряд ферментов, отличающихся меньшей специфичностью. Свойства ряда эндонуклеаз, которые могут быть применены для структурного анализа, приведены в табл. 1.3.

Возможно, наконец, и применение смешанных химико-ферментативных методов для расщепления полинуклеотидов. Так, перед ферментативным расщеплением полинуклеотид подвергают специфической химической модификации, приводящей к тому, что один из типов нуклеотидов, фосфодиэфирная связь которого способна расщепляться под действием данного фермента, превращается в производное, неспособное вступать в ферментативную реакцию. Примером может служить специфическое расщепление модифици-

рованной РНК под действием пиримидил-РНК-азы по остаткам цитидина после предварительного алкилирования остатков уридина в цепи РНК по N-3 с помощью производных карбодиимида[306, 307] или после расщепления остатков уридина с помощью гидроксиламина[308]. Другим примером такого рода является специфическое расщепление РНК с помощью гуанил-РНК-азы по остаткам инозина и 2-*экзо*-N, N-диметиламиногуанозина после предварительной реакции производных гуанозина и 2-*экзо*-N-метилгуанозина с глиоксалем[309]. Более подробно эти реакции будут рассмотрены ниже.

Таблица 1.3. **Некоторые эндонуклеазы, расщепляющие полинуклеотиды**[4]

Фермент	Субстрат	Предпочтительно разрываемые типы связей	Конечные продукты расщепления полинуклеотида
РНК-аза T_2 из такадиастазы	РНК	···Ap ⁞ Np···	Нуклеозид-3′-фосфаты
РНК-аза *Bacillus subtilis*	РНК	···Gp ⁞ Ap··· ···Gp ⁞ Gp···	Нуклеозид-3′-фосфаты и динуклеотиды
РНК-аза *Escherichia coli*	РНК	···Ap ⁞ Np··· ···Up ⁞ Np···	Нуклеозид-3′-фосфаты
Кислая РНК-аза селезенки	РНК	···Ap ⁞ Np···	Нуклеозид-3′-фосфаты и короткие олигонуклеотиды
Нуклеаза микрококков	РНК, одноцепочечная ДНК	···Ap ⁞ Np···Up ⁞ Np··· аналогично для дезоксиряда	Нуклеозид-3′-фосфаты и динуклеотиды
Панкреатическая ДНК-аза I	Двухцепочечные комплексы ДНК	d(···pA ⁞ pT···) d(···pA ⁞ pC···) d(···pG ⁞ pT···) d(···pG ⁞ pC···)	Нуклеозид-5′-фосфаты и динуклеотиды (65%) + тринуклеотиды (25%)
ДНК-аза II селезенки свиньи	То же	d(···Gp ⁞ Gp···) d(···Ap ⁞ Cp···)	Крупные олигонуклеотиды
ДНК-аза I *Escherichia coli*	»	—	Олигонуклеотиды с концевым 5′-фосфатным остатком и средней длиной цепи ~7
Стрептодорназа	»	d(···pN ⁞ pG···) d(···pN ⁞ pA···)	Олигонуклеотиды

Другим возможным сочетанием химических и ферментативных методов является химическая модификация фермента, приводящая к изменению его специфичности. Было показано, например, что расщепление 5S РНК частично алкилированной пиримидил-РНК-азой приводит к более крупным олигонуклеотидным фрагментам, чем действие необработанным ферментом[310].

2. Принципы блочного метода

Единственный подход, который позволил в настоящее время установить полную структуру ряда РНК, — так называемый «блочный метод» — основан на реконструкции структуры полинуклеотида на основании данных о структуре фрагментов, полученных при его частичном расщеплении. При этом проводят расщепление, по крайней мере, двумя разными методами, различающимися по своей специфичности. Обычно для РНК применяют гидролиз пиримидил- и гуанил-РНК-азами. После разделения полученных коротких олигонуклеотидных фрагментов (обзоры — см. [311–317]) их строение устанавливают с помощью рассмотренных ниже методов.

Для тринуклеотидов строение однозначно вытекает из определения концевых нуклеотидных остатков (см. стр. 44). Строение полинуклеотидов большей длины может быть в некоторых случаях установлено однозначно перекрестным расщеплением эндонуклеазой другой специфичности, как это показано ниже для одного из тетрануклеотидов, выделенного при расщеплении аланиновой тРНК пиримидил-РНК-азой:

$$\text{GpGpApCp} \xrightarrow{\text{гуанил-РНК-аза}} 2\text{Gp} + \text{ApCp}$$

В других случаях оказывается полезным последовательное отщепление нуклеотидов с конца цепи или частичный гидролиз олигонуклеотида тем или иным методом.

Известная специфичность ферментов позволяет воссоздать некоторые частичные последовательности полинуклеотидной цепи. Далее проводят расщепление исходного полинуклеотида на более крупные блоки (чаще всего для этой цели применяют частичный гидролиз гуанил-РНК-азой) и отыскивают в них участки нуклеотидных последовательностей, позволяющие однозначно расставить в полинуклеотидной цепи фрагменты, полученные ранее, и воссоздать таким образом полную структуру полинуклеотида. Существенным моментом для успеха такой реконструкции является присутствие в нуклеотидной последовательности уникальных участков, которые могут быть использованы как отправные точки. Для этой цели можно использовать концевые группы, а также редкие компоненты или олигонуклеотиды, встречающиеся в продуктах ферментативного гидролиза полинуклеотида только один раз.

3. Исследование первичной структуры полинуклеотидов

тРНК (обзоры см. [521, 522]). Первым примером полного установления структуры нуклеиновой кислоты была опубликованная в 1965 г. работа Холли с сотр.[318], в которой сообщалось о расшифровке структуры аланиновой тРНК из дрожжей. Мы рассмотрим

эту работу более подробно для иллюстрации конкретного приложения описанных выше принципов *.

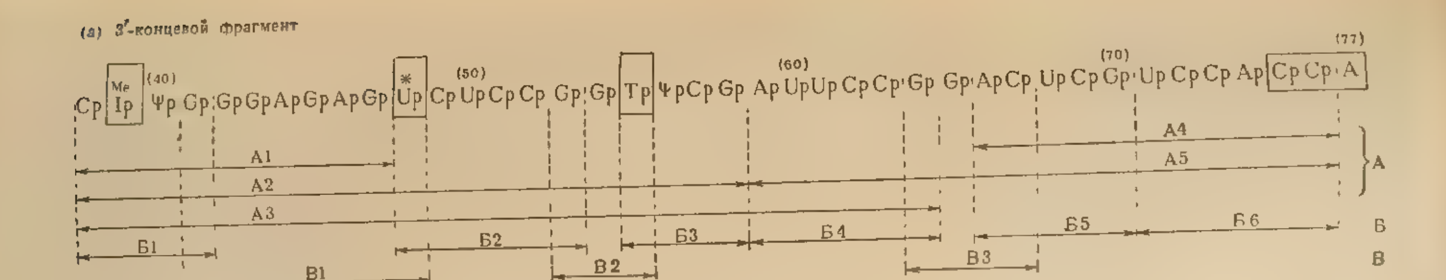
При частичном гидролизе аланиновой тРНК под действием гуанил-РНК-азы были выделены два больших фрагмента (схема 1), каждый из которых соответствовал приблизительно половине молекулы [319]. В состав фрагмента (а), содержащего 3′-концевую группу тРНК, входят редкие компоненты 1-метилинозин (положение 39) и риботимидин (55), которые встречаются только один раз в данной РНК; они могут быть использованы как отправные точки при воссоздании последовательности нуклеотидов в молекуле. Исследуемый препарат аланиновой тРНК был смесью двух близкородственных соединений, у части молекул остаток уридина в положении 48 был заменен на остаток 5,6-дигидроуридина; при гидролизе образовывалась соответствующая смесь близких олигонуклеотидов, которые обычно не разделялись и содержали (по данным спектрофотометрического определения) дробное число молей уридина. Это характерное свойство позволяет однозначно идентифицировать нуклеотиды, содержащие такой фрагмент, и использовать его как отправную точку, подобную редким компонентам; мы будем называть его в дальнейшем компонентом $\overset{*}{U}$.

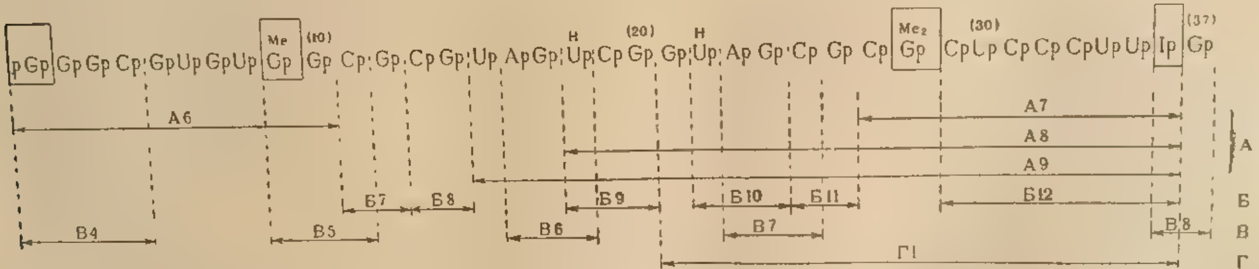
3′-Концевая последовательность нуклеотидов аланиновой тРНК входит в состав гексануклеотида UpCpCpApCpCp (Б6, см. схему 1), образующегося при полном гидролизе тРНК гуанил-РНК-азой. При частичном гидролизе этим же ферментом выделены два фрагмента, содержащие указанную последовательность. Один из них (А4) состоит из 11 остатков нуклеотидов и при полном гидролизе гуанил-РНК-азой дает кроме Б6 пентануклеотид ApCpUpCpGp (Б5), что однозначно решает вопрос о структуре А4. Другой фрагмент (А5) содержит 18 остатков нуклеотидов, при его полном гидролизе гуанил-РНК-азой образуется кроме Б5 и Б6 гуанозин-3′-фосфат и гексануклеотид ApUpUpCpCpGp (Б4). Поскольку при полном гидролизе А5 пиримидил-РНК-азой выделен тетрануклеотид GpGpApCp (В3), вопрос о структуре А5 решается однозначно и последовательность 59—76 исходной тРНК реконструирована.

Остаток 1-метилинозина входит в состав тетрануклеотида Б1, полученного при полном гидролизе тРНК гуанил-РНК-азой, и декануклеотида А1, выделенного при частичном гидролизе этим же ферментом. Последовательность нуклеотидов А1 в значительной степени перекрывается последовательностью нуклеотидов октануклеотида В1, обнаруженного при гидролизе тРНК пиримидил-

---

* Здесь и ниже мы в целях удобства изложения опускаем некоторые детали, не имеющие существенного значения. Результаты рассматриваются не в их исторической последовательности, приводятся только минимальные данные, необходимые для установления структуры, а многочисленные факты, ее подтверждающие, опущены.





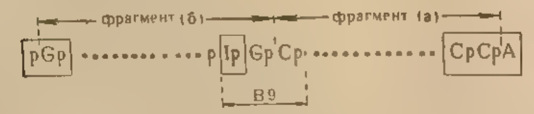


Схема 1. Установление первичной структуры аланиновой тРНК из дрожжей: А1 ... А9 — продукты частичного гидролиза гуанил-РНК-азой; Б1 ... Б12 — продукты полного гидролиза гуанил-РНК-азой; В1 ... В9 — продукты полного гидролиза пиримидил-РНК-азой; Г1 — продукт частичного гидролиза продуктов А гуанил-РНК-азой. Помимо стандартных сокращений (см. стр. 20 приняты следующие обозначения: $\overset{Me}{G}$ — 1-метилгуанозин; $\overset{Me_2}{G}$ — 2-*экзо*-N,N-диметилгуанозин; I — 1-метилинозин; $\overset{H}{U}$ — 5,6-дигидроуридин; $\overset{*}{U}$ — смесь уридина и 5,6-дигидроуридина. Выделены концевые группы и редкие нуклеотиды, использованные как опорные точки при реконструкции последовательности.

РНК-азой, который оканчивается компонентом $\dot{U}$. С другой стороны, октануклеотид В1 входит в состав фрагмента Б2, что позволяет в итоге реконструировать последовательность нуклеотидов 38—53*. Вся данная последовательность входит в состав олигонуклеотида А2, выделенного при частичном гидролизе гуанил-РНК-азой. При полном гидролизе А2 тем же ферментом образуется кроме продуктов, которых можно ожидать на основании уже имеющихся данных, еще 1 *моль* гуанозин-3′-фосфата и уникальный тетрануклеотид ТрΨрСрGр (Б3). Поскольку риботимидин встречается в молекуле только один раз и при гидролизе тРНК пиримидил-РНК-азой образуется тринуклеотид GpGpTp (В2), последовательность нуклеотидов в А2 (38—58) устанавливается однозначно. Наконец, при частичном гидролизе тРНК гуанил-РНК-азой найден олигонуклеотид А3, который при полном расщеплении гуанил-РНК-азой дает кроме продуктов, образующихся при расщеплении А2, уже знакомый нам гексануклеотид Б4; таким образом может быть реконструирована полная последовательность 3′-концевого фрагмента.

Аналогичным путем была установлена последовательность 5′-концевого фрагмента аланиновой тРНК [фрагмент (б) на схеме 1]. В качестве исходных точек можно использовать концевой остаток гуанозин-5′-фосфата и редкие компоненты — 1-метилгуанозин (9), 2-*экзо*-N, N-диметилгуанозин (28) и инозин (36). Последовательность 1—11 вытекает из сопоставления структуры фрагментов А6, В4 и В5, последовательность 27—36 — соответственно из структуры фрагментов А7 и Б12. Некоторые трудности возникли при реконструкции участка 18—26. При полном гидролизе фрагмента А8, содержащего этот участок, под действием гуанил-РНК-азы были обнаружены помимо продуктов гидролиза А7 два тринуклеотида, содержащие дигидроуридиловую кислоту (Б9 и Б10), динуклеотид CpGp (Б11) и гуанозин-3′-фосфат. Присутствие в продуктах расщепления тРНК пиримидил-РНК-азой тринуклеотида ApGpCp (В7) позволяет считать, что фрагменты Б10 и Б11 соединены между собой. При частичном гидролизе гуанил-РНК-азой олигонуклеотид А8 удалось расщепить на тринуклеотид Б9 и фрагмент, состоящий из 16 остатков нуклеотидов (Г1); следовательно, Б9 составляет 5′-конец последовательности А8. 5′-Конец олигонуклеотида Г1 может иметь структуру LXV или LXVa.

$$\mathrm{Gp\overset{H}{U}p \mid ApGpCp \mid GpCp \mid \overset{Me_2}{G}pCp \mid \cdots} \qquad \mathrm{LXV}$$

$$\mathrm{Cp \mid GpGp\overset{H}{U}p \mid ApGpCp \mid \overset{Me_2}{G}pCp \mid \cdots} \qquad \mathrm{LXVa}$$

---

* Недавно показано [505], что фрагмент В1 является в действительности не окта-, а нонануклеотидом и предложенная Холли с сотр. последовательность аланиновой тРНК должна быть изменена: в нее входит дополнительный остаток гуанозина между положениями 47 и 48.

Выбор между ними был сделан на основании того, что при расщеплении Г1 пиримидил-РНК-азой единственным тринуклеотидным продуктом гидролиза является ApGpCp, в то время как при структуре LXVa должен был бы присутствовать также GpGp$\overset{H}{\text{U}}$p. Сопоставление продуктов, образующихся при гидролизе фрагментов А8 и А9 гуанил-РНК-азой, позволяет продлить цепь еще на три нуклеотидных звена и получить таким образом последовательность 15—35.

В продуктах гидролиза 5′-фрагмента (б) аланиновой тРНК под действием пиримидил-РНК-азы обнаружен уникальный динуклеотид IpGp (B8); это однозначно показывает структуру 3′-концевого участка изучаемого фрагмента. Близость редкого компонента к концу цепи изучаемого фрагмента позволяет однозначно решить, что два динуклеотида CpGp (фрагменты Б7 и Б8) должны находиться на участке последовательности 11—14; поскольку структуры обоих динуклеотидов одинаковы, последовательность всего фрагмента (1—36) устанавливается однозначно.

Оба исследуемых фрагмента (а) и (б) имеют, естественно, концевые группы, характерные для полной молекулы тРНК, поэтому их объединение может быть выполнено только одним путем [часть (в) схемы 1]; правильность реконструкции подтверждается выделением уникального тринуклеотида IpGpCp (B9) при расщеплении тРНК пиримидил-РНК-азой. Таким образом, последовательность нуклеотидов вдоль всей цепи молекулы тРНК установлена полностью.

Аналогичные методы были применены для выяснения структуры других транспортных РНК. В 1966—1967 гг. опубликованы данные об установлении структуры тРНК из дрожжей, специфичных для переноса серина[320], тирозина[321], валина[322] и фенилаланина[323]; позднее появился еще ряд работ, посвященных установлению строения различных тРНК[324–327, 506–512]. В первичной структуре различных тРНК наблюдаются определенные общие закономерности; они будут рассмотрены подробнее в гл. 4, посвященной макроструктуре нуклеиновых кислот.

5S РНК. Задача установления строения 5S РНК является более сложной, чем в случае тРНК. Во-первых, этот полинуклеотид имеет несколько большую длину цепи (120 остатков нуклеотидов) и, во-вторых, в его составе отсутствуют редкие компоненты, что уменьшает число опорных точек и делает необходимым получение перекрывания последовательности выделенных фрагментов на большем протяжении. Однако и в данном случае задачу можно решить на основании анализа структур продуктов частичного гидролиза полинуклеотида гуанил-РНК-азой; приходится только выделять и идентифицировать значительно большее число таких фрагментов.

Это было показано на примере установления структуры 5S РНК из клеток культуры тканей КВ[328].

Более интересным является подход, развитый Браунли и сотр. в работе[329], посвященной установлению структуры 5S РНК из *Escherichia coli*, — первой работе, в которой удалось полностью установить последовательность в такого рода полинуклеотидах. Этот подход основан на применении для частичного расщепления полинуклеотидов значительно большего набора методов. В дополнение к частичному расщеплению полинуклеотидов гуанил-РНК-азой, использованному Холли и сотр., здесь применены еще два ферментативных метода частичного расщепления — частичный гидролиз пиримидил-РНК-азой и частичный гидролиз кислой РНК-азой селезенки, не обладающей абсолютной специфичностью (см. стр. 72), а также два химико-ферментативных метода. Первый из них состоит во взаимодействии полинуклеотида с тозилатом N-циклогексил-N′-(β-метилморфолинилэтил)-карбодиимида, который при реакции с остатком уридина дает производное LXVI, устойчивое к действию пиримидил-РНК-азы; при последующей обработке этим ферментом происходит расщепление только фосфодиэфирных связей, образуемых цитидин-3′-фосфатом (см. стр. 72).

LXVI

Второй метод состоит в частичном метилировании полинуклеотида диметилсульфатом и последующей обработке гуанил-РНК-азой. Фосфодиэфирные связи остатков гуанозина, подвергшихся метилированию по N-7, не расщепляются.

В качестве иллюстрации эффективности такого подхода рассмотрим определение 5′-концевой последовательности 5S РНК из 16 нуклеотидов [схема 2, часть (а)]. Отправной точкой здесь может служить концевой остаток уридин-5′-фосфата: он входит в состав динуклеотида E1, полученного при полном гидролизе гуанил-РНК-азой, и тринуклеотида Д1, полученного с помощью хи-

мико-ферментативного расщепления по остаткам цитидина. При расщеплении полинуклеотида гуанил-РНК-азой после частичного метилирования выделен гексануклеотид Г1, структура которого однозначно вытекает из того факта, что в продуктах полного гидролиза РНК гуанил-РНК-азой присутствует тетрануклеотид CpCpUpGp (Е2) и отсутствует изомерный продукт CpUpCpGp. Из продуктов частичного гидролиза пиримидил-РНК-азой выделен фрагмент Б1, который при полном гидролизе этим ферментом дает наряду с другими продуктами 2 *моль* тринуклеотида GpGpCp (Ж1 и Ж2); структура его реконструируется однозначно. Далее, сравнение продуктов гидролиза Б1 и фрагмента В1, образующегося при действии кислой РНК-азы селезенки, позволяет добавить к 3′-концу реконструируемой последовательности остаток Cp. Сравнение В1 с фрагментом А1, полученным при частичном гидролизе гуанил-РНК-азой, дает возможность добавить к известным еще остаток Gp; наконец, фрагмент Б2 содержит еще один остаток Up. Выделенный из продуктов расщепления полинуклеотида гуанил-РНК-азой после частичного метилирования (до действия фермента) гексануклеотид Г2 имеет перекрывающуюся с фрагментом Б2 тетрануклеотидную последовательность; это позволяет добавить к 3′-концу цепи еще два остатка нуклеотида и завершить реконструкцию фрагмента 1.

Аналогично была проведена реконструкция фрагментов 2, 3, 4 и 5 [см. часть (б) схемы 2]; в качестве исходных точек использовались 3′-концевой остаток РНК и уникальные декануклеотиды, найденные в продуктах полного гидролиза полимера под действием гуанил-РНК-азы (последовательности 24—33 и 87—96).

Значительные трудности представляла окончательная реконструкция структуры молекулы, так как на 3′-конце фрагментов 1—4 и на 5′-конце фрагментов 2—5 имеется одинаковая последовательность GpUpApGp. Положение фрагментов 1 и 5 однозначно определяется концевыми группами; наконец, из продуктов частичного гидролиза 5S РНК гуанил-РНК-азой удалось выделить олигонуклеотиды, позволившие связать фрагменты 2, 3 и 4.

Другие компоненты рибосомальной РНК. Молекулярный вес компонентов рибосомальной РНК 23S и 16S значительно выше, чем 5S РНК, и задача полного установления полинуклеотидной последовательности в таких полимерах остается пока нерешенной.

Удалось установить структуру на 5′-концевом остатке рибосомальной РНК из ряда источников [330, 331]; 5′-концевой остаток нуклеозида в полимере был помечен радиоактивным фосфатом с помощью полинуклеотидкиназы (см. стр. 47). Для компонента 16S рибосомальной РНК из *Escherichia coli* была, например, показана пентануклеотидная последовательность pApApApUpGp ..., для компонента 23S — тринуклеотидная pGpGpUp ....

(а) 5′-концевой фрагмент (фрагмент 1)

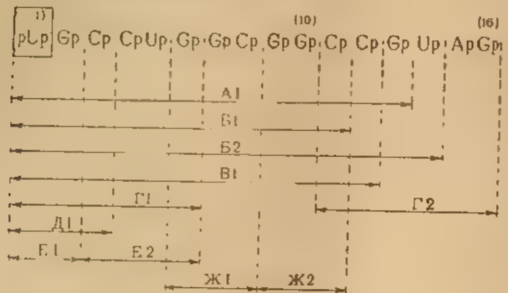


Схема 2. Установление первичной структуры 5S РНК из *Escherichia coli*: А1 — продукт частичного гидролиза гуанил-РНК-азой; Б1, Б2 — продукты частичного гидролиза пиримидил-РНК-азой; В1 — продукт частичного гидролиза кислой РНК-азой селезенки; Г1, Г2 — продукты гидролиза гуанил-РНК-азой после предварительного метилирования; Д1 — продукт гидролиза пиримидил-РНК-азой после обработки карбодиимидом; Е1, Е2 — продукты полного гидролиза гуанил-РНК-азой. Ж1, Ж2 — продукты полного гидролиза пиримидил-РНК-азой.

(б) реконструкция последовательности молекулы

фрагмент 1 — фрагмент 2

pUp ····· (13) GpUpApGp Cp Gp Cp Gp Gp Up Gp (20) Gp Up Cp Cp Cp Ap Cp Cp Up Gp (30) Ap Cp Cp Cp Cp Ap Up Gp Cp Cp Gp Ap Ap Cp Up Cp (40)

фрагмент 2 — фрагмент 3 — фрагмент 4

(50) Ap Gp Ap Ap Gp Up Gp Ap Ap Ap Cp Gp Cp Cp (60) Gp Up Ap Gp Cp Gp Cp Cp Gp Ap Up (70) Gp Gp Up Ap Gp (80) Up Gp Up Gp Gp Gp Gp Up Cp Up Cp (90)

фрагмент 4 — фрагмент 5

Cp Cp Cp Ap Up Gp Cp Gp Ap Gp Ap (100) Gp Up Ap Gp Gp Gp Ap Ap Cp Up Gp Cp Cp Ap Gp Gp Cp Ap (110) U (120)

Осуществлен анализ продуктов, образующихся при полном расщеплении высокомолекулярных компонентов рибосомальных РНК под действием пиримидил- и гуанил-РНК-азы [332, 513]; описано также частичное расщепление упомянутых полинуклеотидов под действием этих ферментов [333, 334], причем получены фрагменты, сравнимые по молекулярному весу с тРНК или 5S РНК. Используя в качестве метки метилированные нуклеозиды, входящие в состав рибосомальной РНК, удалось установить последовательность нуклеотидов на участках, примыкающих к этим компонентам в составе 16S и 23S РНК из *Escherichia coli* [514].

РНК вирусов. В случае вирусных РНК успехи, достигнутые при изучении структуры, еще более ограничены.

С помощью химического метода последовательного отщепления мононуклеотидов удалось показать присутствие последовательности GpCpCpCpA на 3′-конце РНК вируса табачной мозаики [287]; этот результат был подтвержден и другим методом [335, 515]. Сочетанием различных методов удалось установить идентичную ундекануклеотидную последовательность на 3′-конце РНК фагов f2 [288, 515, 516], MS2 [336, 515], R17 [516], а также последовательность из 16 нуклеотидов на 3′-конце РНК фага Q_β [516]. Интересно, что 3′-концевая тетрануклеотидная последовательность во всех исследованных случаях одинакова.

Оригинальный прием был применен для анализа 5′-концевой последовательности РНК фага Q_β [337]. Эта РНК может быть получена биосинтетическим путем с использованием меченых предшественников, что позволяет применить метод «ближайших соседей» (см. стр. 63). На основании распределения радиоактивной метки в 5′-концевом олигонуклеотиде, полученном при гидролизе полимера пиримидил-РНК-азой, при использовании поочередно α-^{32}P-гуанозин-, α-^{32}P-аденозин- и α-^{32}P-цитидин-5′-трифосфатов удается однозначно реконструировать концевую последовательность pppGpGpGpGpApApCpC··· . В другой работе [517] найдено, что препарат РНК фага Q_β негомогенен. Наряду с молекулами, имеющими указанную выше 5′-концевую последовательность, присутствуют также молекулы, содержащие дополнительный остаток гуанозина на 5′-конце. О 5′-концевой последовательности РНК фага MS2 см. [518, 519].

При гидролизе РНК вируса табачной мозаики действием гуанил-РНК-азы удалось выделить три длинных олигонуклеотида уникальной последовательности [338]; для локализации их положения в молекуле РНК использован прием частичной депротеинизации РНК фага. Известно, что депротеинизация фаговой РНК под действием додецилсульфата происходит последовательно, начиная с 5′-конца цепи РНК [339]. Прерывая процесс депротеинизации в разные моменты времени и расщепляя освободившуюся РНК, можно определить относительное расположение различных фрагментов.

Из продуктов частичного гидролиза РНК фага R17 под действием гуанил-РНК-азы T_1 выделен ряд длинных олигонуклеотидов, для одного из которых удалось установить последовательность [520]. Он содержит 57 мононуклеотидных остатков; его нуклеотидная последовательность соответствует последовательности аминокислот 81—99 в белке оболочки фага.

ДНК. Установление полной последовательности оснований в природных ДНК представляется делом довольно отдаленного будущего. Это связано помимо чрезвычайно большого молекулярного веса ДНК с отсутствием специфических методов расщепления, которые позволяли бы получать олигонуклеотидные фрагменты достаточно большой длины и однозначно устанавливать их последовательность.

Доступные в настоящее время методы химического расщепления ДНК (см. стр. 68) позволяют получить полипиримидиновые или полипуриновые фрагменты, содержащие обычно до 6—7 остатков мононуклеотидов [340—342]. Такие фрагменты, вероятно, могли бы оказаться полезными при установлении структуры более длинных фрагментов ДНК, однако специфические методы получения последних не разработаны. Метод химического расщепления был применен для решения некоторых частных вопросов структуры ДНК, например об относительном расположении гликозилированных и негликозилированных остатков 5-оксиметилцитидина в ДНК Т-четных фагов [343].

С другой стороны, существуют методы расщепления ДНК (например, при помощи гидродинамического сдвига), приводящие к фрагментам, размеры которых для структурных исследований слишком велики; эти фрагменты можно примерно оценить по их нуклеотидной последовательности с помощью метода гибридизации (см. стр. 61). Так, подвергая ДНК контролируемому расщеплению при помощи ультразвука, разделяя полученные фрагменты центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия и изучая их способность к гибридизации с разными видами РНК, удалось определить приблизительную длину участков ДНК, ответственных за биосинтез некоторых компонентов рибосомальной РНК, и определить их взаимное расположение [344].

В связи с проблемой установления нуклеотидной последовательности в полинуклеотидах очень большой длины, подобных ДНК, большие перспективы имеют, по-видимому, методы, основанные на применении электронной микроскопии. Расстояние между основаниями в полинуклеотидной цепи денатурированной ДНК составляет около 7 Å. Можно надеяться, что применение электронных микроскопов с достаточно высокой разрешающей способностью позволит непосредственно увидеть отдельные нуклеиновые основания в полинуклеотидной цепи и определить таким образом последовательность мономерных звеньев. Возможность реализации та-

кого подхода зависит от успешного разрешения двух проблем. С одной стороны, существенное значение имеет усовершенствование техники электронной микроскопии и методики приготовления образцов. С другой стороны, необходима разработка методов химической модификации ДНК, позволяющих избирательно пометить различные виды оснований. Важно, чтобы вводимая метка была достаточно хорошо видна при электронной микроскопии, т. е. модифицирующий агент должен содержать атомы тяжелых металлов (например, свинца, ртути, меди, урана) или функциональные группы, способные образовывать устойчивые комплексы с катионами этих металлов. Некоторые реагенты, по крайней мере частично удовлетворяющие поставленным требованиям, уже созданы; они будут упомянуты ниже. Практическая проверка этого интересного подхода к установлению последовательности нуклеотидов в полинуклеотидных цепях, однако, пока еще не осуществлена.

IX. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

Как видно из материала предыдущего раздела, задача установления первичной структуры нуклеиновых кислот является весьма сложной и разрешена пока лишь в некоторых простейших случаях. В связи с этим большое значение для исследований связи структуры и реакционной способности, а также биологической активности приобретают модельные олиго- и полинуклеотиды определенного строения. Некоторые полинуклеотиды такого типа (см. стр. 64) получены из природных объектов, однако систематическое использование модельных полинуклеотидов для решения физико-химических и биологических проблем стало возможным только после разработки методов препаративного получения подобных соединений с помощью химического или ферментативного синтеза. Химические методы синтеза имеют значение для получения олигонуклеотидных соединений; для получения же полинуклеотидов применяются ферментативные и химико-ферментативные методы.

1. Химические методы синтеза *

Ключевой стадией при синтезе олигонуклеотидов является создание 3′—5′-фосфодиэфирной связи между остатками нуклеозидов, входящими в состав полимера. В настоящее время для этого используют два основных метода.

В первом из них («фосфодиэфирном») межнуклеотидная связь возникает при взаимодействии активированного производного

* Обзоры — см. [345–348].

моноэфира фосфорной кислоты (нуклеотидный компонент) и гидроксильной группы второго (нуклеозидного) компонента:

$$RO{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}{-}OH \longrightarrow RO{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}{-}X \xrightarrow{R'OH} RO{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}{-}OR' + HX$$

LXVII

R и R' — различные радикалы

Как правило, активированное производное нуклеотида LXVII получают из нуклеотидного компонента непосредственно в реакционной смеси под действием соответствующего конденсирующего агента (сравнительное изучение таких агентов — см. [349, 350]). Наиболее широко применяются для этой цели дициклогексилкарбодиимид LXVIII (первый реагент, использованный для полимеризации нуклеотидов) [351] и хлорангидриды ароматических сульфокислот, прежде всего мезитиленсульфонилхлорид LXIX ($R = CH_3$) и 2, 4, 6-триизопропилбензолсульфонилхлорид LXIX [$R = (CH_3)_2CH$] [352].

$$C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$$

LXVIII

2,4,6-R₃C₆H₂–SO₂Cl (бензольное кольцо с заместителями R в положениях 2, 4, 6 и группой $-SO_2Cl$)

LXIX

Механизм образования фосфодиэфирной связи под действием дициклогексилкарбодиимида и других подобных реагентов довольно сложен [353, 523]. Первоначально образуются соединения, имеющие, вероятно, структуру имидоилфосфата LXX или смешанного ангидрида LXXI; они превращаются далее через ряд стадий в производное триметафосфата LXXII, которое, по-видимому, является истинным активированным производным нуклеотидного компонента. Подобное производное не может образоваться из диэфира фосфорной кислоты.

$$RO{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}{-}O{-}\overset{\overset{\displaystyle NC_6H_{11}}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle NHC_6H_{11}}{|}}{C}}$$

LXX

$$RO{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}{-}OSO_2Ar$$

LXXI

Циклический триметафосфат: три атома P (каждый с =O и OR), соединённые мостиковыми атомами O в шестичленный цикл.

LXXII

R — различные радикалы

Вследствие этого дальнейшего превращения диэфира в триэфиры не происходит даже при заметном избытке нуклеозидного компонента; этот факт позволяет использовать в качестве нуклеозидного компонента не только производные нуклеозидов, но и защищенные производные нуклеотидов (см. ниже).

Под действием хлорангидридов ароматических сульфокислот может происходить активация и фосфодиэфиров. Эта реакция лежит в основе другого подхода к синтезу олигонуклеотидов (так называемый «триэфирный метод синтеза»)[354]:

$$\mathrm{ROH} \xrightarrow{\mathrm{R'O{-}POX_2}} \mathrm{(RO)(R'O)P(O){-}X} \longleftarrow \underset{\mathrm{LXXIII}}{\mathrm{(RO)(R'O)P(O){-}OH}}$$

$$\underset{\mathrm{LXXIII}}{\mathrm{(RO)(R'O)P(O){-}X}} \xrightarrow[-\mathrm{HX}]{\mathrm{R'''OH}} \underset{\mathrm{LXXIV}}{\mathrm{RO{-}P(O)(OR'){-}OR'''}} \longrightarrow \mathrm{RO{-}P(O)(OH){-}OR'''}$$

R и R''' — остатки нуклеозидов; R' — защитная группа

Промежуточные активированные соединения фосфодиэфиров имеют, видимо, структуру LXXIII ($X = SO_2Ar$); аналогичные соединения можно получить и из соответствующих нуклеозидов. Так, при фосфорилировании нуклеозидов с помощью β,β,β-трихлорэтилфосфодихлорида $CCl_3CH_2OP(O)Cl_2$ образуется активированный диэфир LXXIII ($X = Cl$, $R'' = CCl_3CH_2$)[355]. Группировка R' в исходном диэфире или фосфорилирующем агенте выбирается таким образом, чтобы она могла быть избирательно удалена из промежуточного триэфира LXXIV без расщепления межнуклеотидной связи, что позволяет осуществить переход к желаемому фосфодиэфиру.

Полинуклеотиды можно рассматривать как полимеры нуклеозид-3'-фосфатов или нуклеозид-5'-фосфатов; соответственно нуклеотидный компонент, вводимый в реакцию, может быть производным нуклеозид-3'- или нуклеозид-5'-фосфата. В ряду дезоксирибонуклеотидов наибольшее распространение получил второй путь, в ряду же рибонуклеотидов — первый.

Активированное производное нуклеотидного компонента может вступать в реакцию не только с гидроксильной группой нуклеозидного компонента, но и с другими нуклеофильными функциональными группами присутствующих в реакционной смеси соединений (аминогруппы и гидроксильные группы оснований, фосфатные группы, гидроксильные группы углеводного остатка при C-2'). Для устранения этих побочных реакций необходима защита

функциональных групп в нуклеотидном и нуклеозидном компонентах. Примеры использования различных защитных групп будут рассмотрены ниже; существенно отметить только, что должны применяться лишь такие защитные группы, которые могут быть отщеплены в мягких условиях, не приводящих к расщеплению или изомеризации межнуклеотидной связи (см. главу 10).

Возможность взаимодействия активированного производного нуклеотида с водой делает необходимым проведение синтеза олигонуклеотидов в строго безводных условиях; в некоторых случаях это вызывает трудности из-за плохой растворимости производных нуклеотидов в органических растворителях.

Несмотря на применение защищенных производных нуклеотидов и нуклеозидов, некоторые побочные реакции (например, образование пирофосфатов при синтезе исходя из моноэфиров фосфорной кислоты) все же имеют место; вследствие этого требуется тщательная хроматографическая очистка продуктов реакции. Одним из приемов, позволяющих существенно упростить очистку продуктов реакции, является фиксация одного из компонентов реакционной смеси на полимерном носителе [356–360]. Такой полимер может быть легко отделен от других компонентов реакционной смеси. Продукт реакции, фиксированный на полимере, можно подвергать дальнейшим превращениям, что значительно упрощает многостадийные синтезы. Наконец, после выполнения всех стадий продукт может быть отщеплен от полимера и выделен в чистом состоянии. Такой подход к синтезу олигонуклеотидов привлекает сейчас большое внимание *. Неспецифичность химических методов создания межнуклеотидной связи, являющаяся недостатком химического подхода к синтезу олигонуклеотидов (получение защищенных производных нуклеозидов и нуклеотидов требует многостадийных синтезов), в данном случае дает ряд преимуществ, поскольку в синтез олигонуклеотидов могут быть введены самые разнообразные производные нуклеозидов, в том числе и синтетические аналоги компонентов нуклеиновых кислот. Это открывает широкие возможности исследования связи структуры и функции природных полинуклеотидов.

Олигодезоксирибонуклеотиды. Простейшим подходом к получению гомогенных олигодезоксинуклеотидов является полимеризация (точнее поликонденсация) мононуклеотидов. Так, при полимеризации тимидин-5′-фосфата под действием дициклогексилкарбодиимида были получены олигонуклеотиды общей формулы $(pdT)_n$ со степенью полимеризации до 15 [361–363]. Одной из существенных побоч-

* Существенным условием успеха при многостадийном синтезе на полимерных носителях является количественное протекание отдельных стадий процесса: этого не удается пока достичь с помощью существующих методов создания фосфодиэфирной связи.

ных реакций, происходящих при полимеризации, является образование циклических олигонуклеотидов; для ее подавления к реакционной смеси добавляют «терминатор полимеризации»— 3′-О-ацетилтимидин-5′-фосфат; в этом случае образуются олигонуклеотиды, у которых 3′-концевая гидроксильная группа блокирована, что позволяет исключить циклизацию. Аналогичный прием был использован для полимеризации других дезоксинуклеозид-5′-фосфатов. В реакцию вводились защищенные по ядру производные: 4-*экзо*-N-анизоилдезоксицитидин-5′-фосфат LXXV (R=H), 6-*экзо*-N-бензоилдезоксиаденозин-5′-фосфат LXXVI (R = H) или 2-*экзо*-N-ацетилдезоксигуанозин-5′-фосфат LXXVII (R=H) в качестве полимеризующегося звена и их 3′-О-ацетаты (LXXV—LXXVII; R=CH_3CO) в качестве терминаторов полимеризации. После отщепления защитных групп действием аммиака удается получить олигоцитидиловые[364], олигоадениловые[365] и олигогуаниловые[366] кислоты, содержащие 5′-концевую фосфатную группу.

LXXV

LXXVI

LXXVII

При использовании в качестве терминатора полимеризации ацетильного производного нуклеозид-5′-фосфата, отличающегося по структуре гетероциклического ядра от полимеризующегося звена, удается получить олигонуклеотиды общей структуры $(pN)_m pX$. Подобные соединения были получены, например, при

полимеризации смеси тимидин-5′-фосфата и 4-*экзо*-N,3′-O-диацетилдезоксицитидин-5′-фосфата[362]:

$$n\text{pdT} + \text{pdC}\overset{\text{Ac}}{-}\text{Ac} \xrightarrow[\text{2. } NH_4OH]{\text{1. Дициклогексилкарбодиимид}} (\text{pdT})_n\text{pdC}$$

Подход, основанный на полимеризации защищенных дезоксинуклеозид-3′-фосфатов, был также исследован[367]; в этом случае получаются менее удовлетворительные результаты.

В качестве полимеризующегося звена можно использовать динуклеотиды с 5′-концевой фосфатной группой (получение таких соединений — см. ниже); в результате такой блок-полимеризации образуются олигонуклеотиды, содержащие повторяющуюся динуклеотидную последовательность[368, 369], например, в случае 5′-фосфотимидилил-(3′ → 5′)-2-*экзо*-N-ацетилдезоксигуанозина:

$$n\text{pdTpd}\overset{\text{Ac}}{\text{G}} \xrightarrow[\text{2. } NH_4OH]{\text{1. Дициклогексилкарбодиимид}} (\text{pdTpdG})_n \quad n = 2-6$$

Аналогичный подход — полимеризация три- или тетрануклеотидного блока — был также использован для получения олигонуклеотидов с повторяющейся тринуклеотидной[370, 371] и тетрануклеотидной[372] последовательностью. Для синтеза соединений такого типа часто применяется и другой подход, основанный на ступенчатом наращивании цепи олигонуклеотида.

В этом случае возможно уже получение олигонуклеотидов с любой заранее заданной последовательностью мономерных звеньев. В простейшем варианте синтеза динуклеозидмонофосфата оба компонента, вводимые в реакцию, — нуклеотидный и нуклеозидный — являются мономерами. Первый синтез природного динуклеозидмонофосфата[373] — тимидилил-(3′→5′)-тимидина — был осуществлен с помощью фосфотриэфирного метода. Взаимодействием 5′-O-ацетилтимидин-3′-бензилхлорфосфата LXXVIII (R′ = Ac; R″ = $PhCH_2$, X = Cl) с 3′-O-ацетилтимидином LXXIX (R‴ = Ac) получен промежуточный триэфир LXXX (R′ = R‴ = Ac; R″ = $PhCH_2$), который после гидрогенолиза для удаления бензильной группы и дезацетилирования обработкой щелочью превращался в динуклеозидфосфат LXXXI (стр. 89).

Аналогичные синтезы с помощью фосфотриэфирного метода были выполнены и в последнее время[354, 355]. В качестве нуклеотидного компонента использовали 5′-O-тритилтимидин-3′-(β,β,β-трихлорэтил)-фосфат LXXVIII (R′ = Tr; R″ = CCl_3CH_2; X = Cl) или

5'-O-тритилтимидин-3'-(β-цианоэтил) фосфат LXXVIII ($R' = Tr$; $R' = CNCH_2CH_2$; X = OH), активированный 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлоридом. Отщепление β,β,β-трихлорэтильной группы от промежуточного триэфира может быть выполнено восстановлением с помощью цинк-медной пары, а отщепление β-цианоэтильной группы — мягкой обработкой щелочью.

LXXVIII + LXXIX → LXXX → LXXXI

B—остаток тимина

При ступенчатом синтезе олигонуклеотидов фосфодиэфирным методом в качестве нуклеотидного компонента обычно применяют производные нуклеозид-5'-фосфатов. Так, тимидилил-(3'→5')-тимидин был получен взаимодействием 3'-O-ацетилтимидин-5'-фосфата LXXXII и 5'-O-тритилтимидина в присутствии дициклогексилкарбодиимида[351] (стр. 90).

Полученный защищенный динуклеозидмонофосфат LXXXIIIа после обработки разбавленной кислотой для удаления трифенилметильной группы и аммиаком для удаления ацетильной группы может быть превращен в динуклеозидмонофосфат LXXXI. Промежуточный продукт LXXXIIIб, возникающий после отщепления только одной из защитных групп, может быть вновь использован в качестве нуклеозидного компонента для создания фосфодиэфирной связи. Конденсация его с соответствующим защищенным нуклеозид-5'-фосфатом [например, LXXV—LXXVII ($R=COCH_3$)] позволяет получить защищенный тринуклеозиддифосфат; этот процесс

наращивания нуклеотидной цепи на 3′-конце может быть повторен и далее.

LXXXII + ⟶ ⟶ LXXXI

LXXXIII а (R=$COCH_3$)
б (R=H)

B—остаток тимина

Подобная последовательность реакций была использована для синтеза многих олигодезоксинуклеотидов[369, 374–378], например додекануклеотида, содержащего остатки тимидина и цитидина:

d(Tr—T) —(1. pdT—Ac дициклогексилкарбодиимид; 2. OH^-)→ d(Tr—TpT) —(3. pdČ—Ac; дициклогексилкарбодиимид; 4. OH^-)→

⟶ d(Tr—TpTpČ) —(5—8. Реакции 1 и 2, повторенные дважды; 9—10. Реакции 3 и 4)→

⟶ d(Tr—TpTpČpTpTpČ) —(повторение реакций 5—10 дважды)→

⟶ d[Tr—TpTpČp(TpTpČp)$_3$] —(11. H^+; 12. OH^-)→ d(TpTpCp)$_4$

где Č — остаток 4-*экзо*-N-анизоилдезоксицитидина.

Аналогичный прием — использование в качестве нуклеозидного компонента олигонуклеотида и наращивание полимерной цепи с 3′-конца — был использован и при синтезе олигонуклеотидов на полимерном носителе[357–360]. В этом случае был успешно реализован и другой вариант — наращивание полимерной цепи с 5′-конца с ис-

пользованием в качестве нуклеозидного компонента 3′-защищенного олигонуклеотида (на первой стадии — защищенного нуклеозида)[379]:

дициклогексилкарбодиимид

H^+

1. дициклогексилкарбодиимид
2. H^+

OH^- → d(TpTp)

B — остаток тимина

Ⓟ — остаток полимерного носителя

$R = (CH_3OC_6H_4)_2CC_6H_5$

Более удобным в этом случае является, однако, использование в качестве нуклеотидного компонента олигонуклеотида с

3′-концевой фосфатной группой[356, 380], как показано на следующей схеме:

$CH_2O-Ⓟ$ … B … HO

1. $NCCH_2CH_2OPO_3H_2$; $(CH_3)_3C_6H_2SO_2Cl$

CH_2OH … B … RO

$CH_2O-Ⓟ$ … B … $O=P-OH$ … OCH_2CH_2CN

2. $(i-C_3H_7)_3C_6H_2SO_2Cl$

$CH_2O-Ⓟ$ … B … $O=P-OCH_2CH_2CN$ … OCH_2 … B … RO

3. N_2H_4

$CH_2O-Ⓟ$ … B … $O=P-OCH_2CH_2CN$ … OCH_2 … B … HO

4. повторение реакций 1–3
5. OH^-
6. H^+

d(TpTpT)

B–остаток тимина; Ⓟ–остаток полимерного носителя; $R=C_6H_5COCH_2CH_2CO-$

Аналогичный подход к наращиванию олигонуклеотидной цепи был осуществлен и для реакции без полимерного носителя[354, 355].

В качестве нуклеотидного компонента можно применять и олигонуклеотид с 5′-концевой фосфатной группой[381, 382]. Такие олигонуклеотиды могут быть получены ступенчатым наращиванием олигонуклеотидной цепи с 3′-конца при использовании в качестве «нуклеозидного» компонента защищенных по фосфатной группе производных нуклеозид-5′-фосфатов типа LXXXIV, например нуклеозид-5′-(β-цианоэтил)-фосфатов LXXXIVа[383–385], нуклеозид-5′-(β,β,β-трихлорэтил)-фосфатов LXXXIVб[386, 387] или продуктов конденсации

дезоксинуклеозид-5′-фосфатов с 2′,3′-(диметоксибензилиден)-уридином (LXXXIVв) [388, 389].

LXXXIV

а. R = $NCCH_2CH_2-$

б. R = CCl_3CH_2-

в. R = $-OCH_2$ (2′,3′-(диметоксибензилиден)-уридин)

В—остаток основания

Конденсация олигомерного нуклеозидного компонента с олигомерным нуклеотидным компонентом позволяет наращивать полимерную цепь сразу на несколько звеньев, что существенно облегчает получение длинных олигонуклеотидов. Примером эффективности такого приема может служить синтез олигонуклеотида, содержащего 24 остатка тимидина, конденсацией двух додекануклеотидов [390], а также синтез додекануклеотида с разными остатками нуклеозидов:

$$d[NCCH_2CH_2{-}pT(pT)_{11}] + d[(pT)_{11}pT{-}Ac] \xrightarrow[\text{2. OH}^-]{\text{1. Мезитиленсульфохлорид}} d(pT)_{24}$$

$$d(NCCH_2CH_2{-}pTpTp\breve{A}p\breve{A}pTpT) + d[p\breve{A}p\breve{C}p\breve{A}p\breve{A}pTp\breve{A}{-}Ac] \xrightarrow[\text{2. OH}^-]{\text{1. Мезитиленсульфохлорид}}$$

$$\longrightarrow d(pTpTp\breve{A}p\breve{A}pTpTp\breve{A}p\breve{C}p\breve{A}p\breve{A}pTp\breve{A})$$

где $\breve{A}$ — остаток 6-*экзо*-N-бензоилдезоксиаденозина, $\breve{C}$ — остаток 4-*экзо*-N-анизоилдезоксицитидина.

Олигорибонуклеотиды. Методы химического синтеза в этом ряду соединений разработаны значительно меньше, чем в случае олигодезоксинуклеотидов. Относительно доступными являются лишь тринуклеозиддифосфаты [391, 392], синтезу же олигонуклеотидов более высокой степени полимеризации посвящено лишь несколько работ [393–395]. Это связано, прежде всего, со значительной лабильностью межнуклеотидной связи рибонуклеотидов в щелочной среде и способностью ее к изомеризации в кислой среде (см. главу 10), что осложняет выбор защитных групп; значительные трудности

возникают также из-за необходимости защиты 2′-гидроксильной группы вводимых в реакцию нуклеозидов и нуклеотидов.

Обычный подход к синтезу олигорибонуклеотидов состоит в ступенчатом наращивании олигонуклеотидной цепи с 5′-конца. Для синтеза динуклеозидфосфатов используют обычно в качестве нуклеотидного компонента 2′,5′-защищенные рибонуклеозид-3′-фосфаты LXXXV, а в качестве нуклеозидного компонента — 2′,3′-защищенные рибонуклеозиды LXXXVI.

LXXXV + LXXXVI —(дициклогексилкарбодиимид)→ LXXXVII → LXXXVIII

B—остаток основания

Так, удобно вводить в реакцию 2′,5′-ди-О-ацетилнуклеозид-3′-фосфаты и 2′,3′-О-(*п*-метоксибензилиден)- или 2′,3′-О-(*п*-диметиламинобензилиден)-нуклеозиды [396, 397]. После мягкого щелочного и кислотного гидролиза защищенный динуклеозид LXXXVII (R=R′=Ac; R″+R″=>CHAr) переводят в свободный динуклеозидмонофосфат LXXXVIII (R′ = R″ = H).

Для дальнейшего наращивания цепи существенно, чтобы 5′-гидроксильная группа промежуточного защищенного динуклеозида могла быть освобождена в условиях, когда остальные защитные группы остаются незатронутыми, т. е. чтобы был возможен переход от защищенного LXXXVII к частично защищенному динуклеозидмонофосфату LXXXVIII (R′ и R″ — защитные группировки). Такой частично защищенный динуклеозидфосфат может быть использован в качестве нуклеозидного компонента при дальнейшем синтезе — его конденсация с нуклеотидом LXXXV приводит к защищенному тринуклеозиддифосфату.

Наиболее успешным оказался подход, основанный на использовании в качестве нуклеотидного компонента 5′-О-моно(или ди-)метокситритил-2′-О-ацетилнуклеозид-3′-фосфатов, а в качестве нуклеозидного — 2′,3′-ди-О-ацетил(или бензоил-)нуклеозидов (аминогруппы гетероциклических ядер обоих компонентов также должны быть защищены). Таким путем были получены все 64 возможных тринуклеозиддифосфата, составленные из обычных нуклеотидов, входящих в состав РНК[39].

Реализация другого подхода, основанного на применении для защиты 5′-гидроксильной группы нуклеотидного компонента ацетильной (щелочнолабильной) группы, оказалась несколько более сложной[398–400], однако, исходя из 5′-О-ацетил-2′-О-(α-этоксиэтил)-нуклеозид-3′-фосфатов и 2′,3′-О-этоксиметилиденнуклеозидов (для защиты аминогрупп ядра использованы диметиламинометилиденовые производные, см. стр. 421), удалось получить ряд тринуклеозиддифосфатов[392, 401, 402].

Динуклеотиды с 3′-концевой фосфатной группой могут быть получены прямым фосфорилированием динуклеозидмонофосфатов[403] или синтезом с использованием в качестве нуклеозидного компонента защищенных производных нуклеозид-3′-фосфатов[404–407] или нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов[407–409], например:

1. дициклогексилкарбодиимид
2. NH_4OH
3. H^+

1. дициклогексилкарбодиимид
2. пиримидил-РНК-аза
3. NH_4OH

B^1, B^2 — остатки оснований

Предложен и другой подход к получению динуклеозидмонофосфатов, основанный на конденсации 2′,3′-дизамещенного нуклеозид-

5'-фосфата и 2',5'-дизамещенного нуклеозида [410, 411], например:

B^1, B^2—остатки оснований

2. Принципы ферментативного синтеза олиго- и полинуклеотидов

Для ферментативного синтеза фосфодиэфирной связи в олиго- и полинуклеотидах используются ферменты трех различных групп.

Выше уже рассматривалось (см. стр. 69) расщепление поли- и олигорибонуклеотидов под действием рибонуклеаз. Первая стадия реакции — превращение фосфодиэфира рибонуклеозида в циклофосфат — в значительной степени обратима, и в определенных условиях при обработке циклического фосфата моно- или олигонуклеотида (нуклеотидный компонент) избытком нуклеозида или нуклеозид-3'-фосфата (нуклеозидный компонент) удается достигнуть образования 3'→5'-фосфодиэфирной связи:

Здесь B — остаток основания; R — атом водорода, остаток моно- или олигонуклеотида; R' — остаток нуклеозида или нуклеотида.

Возможность применения рибонуклеаз для синтеза межнуклеотидной связи была впервые обнаружена в случае пиримидил-

РНК-азы (панкреатической РНК-азы)[412–415]. Аналогичные реакции удалось осуществить с гуанил-РНК-азой T_1[416–419] и гуанил-РНК-азой актиномицетов[420], а также с некоторыми другими РНК-азами, обладающими менее ярко выраженной специфичностью к структуре основания нуклеотидного компонента[421].

Другая группа ферментов катализирует образование олиго- или полинуклеотидов с 3'→5'-фосфодиэфирными связями из рибо- или дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов или рибонуклеозид-5'-дифосфатов. Протекающие при этом реакции могут быть схематически представлены уравнениями:

$$n\text{pppN} \longrightarrow (\text{pN})_n + n\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$$

$$n\text{ppN} \rightleftarrows (\text{pN})_n + n\text{H}_3\text{PO}_4$$

Некоторые свойства ферментов этой группы, используемых для получения полинуклеотидов, приведены в табл. 1.4.

Можно видеть, что перечисленные ферменты обладают довольно узкой специфичностью по отношению к структуре сахарного остатка нуклеозидди- или трифосфата; в то же самое время специфичность их по отношению к природе гетероциклического основания довольно широка. Помимо ди- и трифосфатов нуклеозидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, в ряде случаев удается добиться включения в полимер и аналогов природных нуклеотидов.

В полимеризацию, катализируемую ферментами этой группы, могут вступать только производные мононуклеотидов; попытки осуществить аналогичную полимеризацию производных ди- и олигонуклеотидов оказались безуспешными. Молекулярный вес образующегося полимера в значительной степени зависит от условий полимеризации; часто удается получить как олигонуклеотиды (например, тринуклеозиддифосфаты при реакции, катализируемой полинуклеотидфосфорилазой), так и полинуклеотиды с молекулярным весом в несколько миллионов.

Для протекания ферментативной полимеризации нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов, как правило, необходимо присутствие в инкубационной смеси помимо фермента и мононуклеотидных предшественников определенного количества олиго- или полинуклеотида, который может выполнять различные функции.

1) Олигонуклеотид с 3'-концевой гидроксильной группой может служить «затравкой» полимеризации, т. е. акцептором, к которому присоединяются полимеризующиеся остатки мононуклеотидов. Последовательность мономеров в растущей полимерной цепи при этом не зависит от последовательности мономеров в добавленном олиго- или полинуклеотиде; добавленная затравка входит в состав продукта реакции, составляя его 5'-концевую последовательность. Такая функция олиго- или полинуклеотида наблюдается для реакций, катализируемых терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой и полинуклеотидфосфорилазой.

Таблица 1.4. **Ферменты, катализирующие полимеризацию нуклеозид-5′-ди- и -трифосфатов**

Фермент	Обычный источник выделения	Структура субстрата	Возможность полимеризации без добавления олиго- или полинуклеотида	Возможность функционирования олиго- или полинуклеотида в качестве			Литература
				инициатора	затравки	матрицы	
ДНК-полимераза (дупликаза)	*Escherichia coli*, тимус теленка	Дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфат	+	—	+	+	Обзоры: *41, 422—424*
Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (аддаза)	Тимус теленка	То же	—	—	+	—	*425—427*
Полинуклеотидфосфорилаза	*Azotobacter vinelandii*, *Micrococcus lysodeikticus*	Рибонуклеозид-5′-дифосфат	+ (?)	+	+	—	Обзоры: *428, 429*
РНК-полимераза (транскриптаза)	Печень крыс, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*	Рибонуклеозид-5′-трифосфат	+	—	—	+	Обзоры: *424, 428, 430—432*
РНК-синтетаза (РНК-репликаза)	*Escherichia coli*, инфицированная фагами f2, *MS2*, Q_β и др.	Рибонуклеозид-5′-трифосфат	—	—	—	+	*433—435*

2) Олигонуклеотид с 3'-концевой фосфатной группой может резко увеличивать скорость ферментативной полимеризации, не включаясь в состав продукта реакции и не влияя на последовательность мономеров в нем. В этом случае говорят, что олигонуклеотид действует как «инициатор». Механизм действия инициаторов не выяснен; единственный надежно доказанный случай такого функционирования олигонуклеотида — реакция, катализируемая полинуклеотидфосфорилазой.

3) Наконец, олиго- или полинуклеотид может служить «матрицей», которая определяет последовательность нуклеотидов в образующемся полимере и сама не входит в состав продукта реакции. При матричном синтезе продукт реакции является комплементарной копией полинуклеотидной цепи матрицы. Этот случай наблюдается в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой, РНК-полимеразой и РНК-синтетазой.

Иногда наблюдается и более сложная функция олиго- или полинуклеотида в ферментативной полимеризации. Так, при добавлении к ДНК-полимеразе двухцепочечных комплексов олигодезоксинуклеотидов, цепи которых имеют различную длину, происходит достраивание их до полных двухцепочечных комплексов. При этом одна из цепей комплекса служит затравкой полимеризации, а другая — матрицей, определяющей нуклеотидную последовательность синтезирующегося участка полимера.

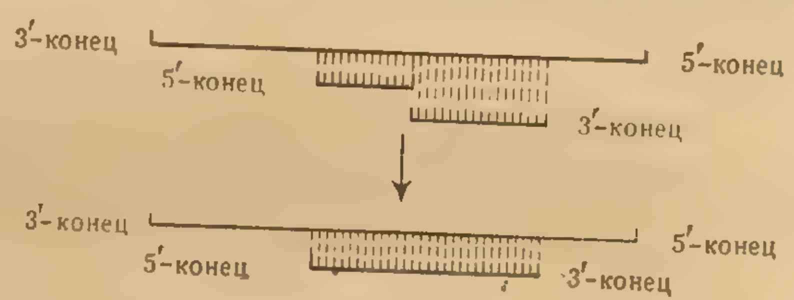
Если в реакцию, катализируемую РНК-полимеразой, вводится только один нуклеозид-5'-трифосфат (из четырех), происходит синтез гомополимера, структура которого не является комплементарной копией добавленного полинуклеотида. При таком синтезе — синтезе «повторением» (reiteration) — полимеризация начинается на участке полинуклеотидной матрицы, содержащем последовательность по крайней мере трех остатков нуклеотидов, комплементарных добавленному единственному нуклеозидтрифосфату. Продукт, образовавшийся в результате такого частичного копирования последовательности матрицы, служит затравкой для дальнейшей ферментативной полимеризации, приводящей к гомополинуклеотиду.

В некоторых случаях возможна ферментативная полимеризация и в отсутствие добавляемого олиго- или полинуклеотида. Обычные препараты полинуклеотидфосфорилазы катализируют полимеризацию нуклеозиддифосфатов и без затравки или инициатора. Такая способность, однако, теряется при дальнейшей очистке фермента; она связана, очевидно, с присутствием олигонуклеотидов в малоочищенных ферментных препаратах. В некоторых условиях удается осуществить синтез полинуклеотидов без матрицы с ДНК- и РНК-полимеразами; эти случаи будут рассмотрены ниже.

Специфичность рассматриваемых ферментов по отношению к структуре добавляемого олиго- или полинуклеотида, как правило,

весьма широкая. Единственным исключением служат РНК-синтетазы, которые значительно более эффективно используют в качестве матрицы РНК соответствующих фагов. Для терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы затравкой могут служить как полидезоксинуклеотиды, так и олигодезоксинуклеотиды, начиная с тринуклеозиддифосфата. Эффективными затравками реакции, катализируемой полинуклеотидфосфорилазой, являются низкомолекулярные олигорибонуклеотиды, в том числе динуклеозидмонофосфаты. В реакции, катализируемой ДНК-полимеразой, в качестве матрицы могут выступать полидезоксинуклеотиды и некоторые полирибонуклеотиды. Однако полимеризация происходит и в присутствии коротких олигодезоксинуклеотидов. Очень медленная полимеризация наблюдается уже с тринуклеозиддифосфатами, заметно больше скорость реакции с гепта — декадезоксинуклеотидами. РНК-полимеразы из микроорганизмов могут использовать в качестве матрицы одно- и двухцепочечные полидезоксирибонуклеотиды и полирибонуклеотиды, а также олигодезоксирибонуклеотиды со степенью полимеризации 5 и выше и олигорибонуклеотиды приблизительно такого же размера.

Наконец, представителем еще одной группы ферментов, которая может быть использована для получения синтетических полинуклеотидов, является недавно открытый фермент *, катализирующий образование фосфодиэфирных связей между 5′-концевой фосфатной группой и 3′-концевой гидроксильной группой олигодезоксинуклеотидов, входящих в состав двухцепочечных комплексов [436-438]. Реакция может быть схематически представлена следующим образом:



В рассматриваемую ферментативную реакцию могут вступать как полидезоксирибонуклеотиды (двухспиральные комплексы ДНК, одна из цепей которых содержит разрывы фосфодиэфирных связей), так и относительно короткие олигодезоксирибонуклеотиды со степенью полимеризации 6—7 [439].

Олиго- и полидезоксирибонуклеотиды. В ряду олигодезоксирибонуклеотидов ферментативные методы синтеза имеют весьма огра-

* Этот фермент известен под названиями: полинуклеотид-соединяющий фермент, ДНК-лигаза, ДНК-силаза (от seal — запаивать).

ниченное применение. Подобраны условия, в которых терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза катализирует присоединение лишь небольшого количества мононуклеотидных единиц к добавленной затравке. Таким путем можно получить блок-олигомеры, например[440]

$$d[pT(pT)_5(pA)_{8-14}]; \qquad d[pT(pT)_5(pG)_{8-12}] \quad \text{или} \quad d[pT(pT)_5(pC)_{1-2}(pT)_{1-2}]$$

В ряду полидезоксирибонуклеотидов лучше всего разработаны методы получения гомополимеров и полимеров, содержащих повторяющуюся олигонуклеотидную последовательность.

Синтез полимеров первого типа может быть выполнен с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы. Так, исходя из олигодезоксиадениловых кислот и 2′-дезоксиаденозин-5′-трифосфата, получают полидезоксиадениловую кислоту[441]:

$$(pdA)_3 + n\text{pppdA} \longrightarrow (pdA)_{n+3}$$

Продуктами реакции являются одноцепочечные полидезоксинуклеотиды, степень полимеризации которых в ряде случаев достигает 600 *.

Двухцепочечные комплексы гомогенных полидезоксинуклеотидов могут быть получены с помощью ДНК-полимеразы. При инкубации фермента без матрицы со смесью дезоксицитидин-5′-трифосфата и дезоксигуанозинтрифосфата (или дезоксиинозин-5′-трифосфата) после некоторого индукционного периода происходит[442, 443] синтез комплексов (поли-pdC) · (поли-pdG) или (поли-pdC) · (поли-pdI). После денатурации и центрифугирования в градиенте сульфата цезия удается получить соответствующие одноцепочечные полимеры[444].

$$n\text{pppdG} + n\text{pppdC} \xrightarrow[\text{без матрицы}]{\text{ДНК-полимераза}} (pdG)_n \cdot (pdC)_n$$

При аналогичной реакции с ДНК-полимеразой без матрицы из смеси дезоксиаденозин-5′-трифосфата и тимидин-5′-трифосфата образуется полимер с чередующейся последовательностью нуклеозидов[445]:

$$n\text{pppdA} + n\text{pppdT} \xrightarrow[\text{без матрицы}]{\text{ДНК-полимераза}} d(pApT)_n$$

Для получения гомогенных полидезоксиадениловой и политимидиловой кислот необходимо использовать полимеризацию в присутствии матрицы. В качестве последней могут быть использованы полиадениловая или полиуридиловая кислоты[446, 447], а также синте-

---

* Относительная доступность некоторых гомодезоксиполинуклеотидов дает возможность получать соответствующие олигодезоксинуклеотиды их ферментативной деградацией. Для этой цели используют ДНК-азу I и нуклеазу микрококков (см. стр. 72).

тические олигодезоксирибонуклеотиды, например комплекс $(pdA)_7 \cdot (pdT)_{11}$ [448].

$$n\text{pppdA} \xrightarrow[\text{(pdA)}_7\cdot\text{(pdT)}_{11}]{\text{ДНК-полимераза}} (\text{pdA})_n \quad n = 50—100$$

$$n\text{pppdA} + n\text{pppdT} \xrightarrow[\text{(pdA)}_7\cdot\text{(pdT)}_{11}]{\text{ДНК-полимераза}} (\text{pdA})_n \cdot (\text{pdT})_n \quad n \approx 5000$$

Образующиеся в результате реакции двухцепочечные комплексы могут быть разделены препаративным центрифугированием в градиенте хлористого цезия после денатурации действием щелочи [449]. Полученные продукты имеют мол. вес. от 10^5 до $4 \cdot 10^6$.

В качестве матрицы для ДНК-полимеразы можно использовать синтетические олигодезоксинуклеотиды, содержащие чередующуюся последовательность остатков нуклеотидов [448, 450]; продуктом реакции в этом случае являются соответствующие полидезоксинуклеотиды, например:

$$n\text{pppdA} + n\text{pppdC} + n\text{pppdG} + n\text{pppdT} \xrightarrow[\text{[d(pTpC)}_5\text{]}\cdot\text{[d(pApG)}_5\text{]}]{\text{ДНК-полимераза,}}$$

$$\longrightarrow [\text{d(pTpC)}_n \cdot [\text{d (pApG)}_n] \quad \text{Мол. вес} \sim 1 \cdot 10^6$$

Аналогичный подход был применен для синтеза полидезоксинуклеотидов с повторяющимися тринуклеотидными [451] и тетрануклеотидными [452] последовательностями.

С помощью ДНК-полимеразы удается осуществить и синтез полинуклеотидов, содержащих аналоги природных нуклеозидов [453]. В частности, получены полинуклеотиды, содержащие остатки 5-замещенных пиримидиновых дезоксинуклеотидов [444] (например, 5-бромдезоксицитидина LXXXIX), 2'-дезоксиуридина [454] XC и 4-тиотимидина XCI [455].

LXXXIX XC XCI

Гетерополидезоксинуклеотиды со случайным расположением нуклеозидных остатков можно получить с помощью реакции, катализируемой терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой [456—458].

Соединение синтетических олигодезоксирибонуклеотидов с помощью полинуклеотидсоединяющего фермента позволяет осуще-

ствить синтез полинуклеотидов со специфической последовательностью оснований. Так, Корапе с сотр.[459] удалось получить двухцепочечный полинуклеотид XCII, соответствующий по своему строению фрагменту ДНК, ответственному за синтез части последовательности аланиновой тРНК:

```
|←—— фрагмент 4 ——→|←———————— фрагмент 1 ————————→|
 3'-конец                                        5'-конец
d(G-A-G-G-G-A-A-T-C-G-T-A-C-C-C-T-C-T-C-A-G-A-G-G-C-C-A-A-G)
  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
d(G-C-T-C-C-C-T-T-A-G-C-A-T-G-G-G-A-G-A-G-T-C-T-C-C-G-G) 3'-конец
                 (10)                (20)      (27)
 5'-конец
|←—————— фрагмент 2 ——————→|←—— фрагмент 3 ——→|
```

XCII

Использованные для ферментативной реакции олигонуклеотидные фрагменты 1—4 были получены химическим синтезом. Можно использовать для частичного синтеза подобных полинуклеотидов и ферментативную полимеризацию. Так, полинуклеотид, содержащий фрагменты 1 и 2, может быть достроен до двухцепочечного комплекса полинуклеотида XCI действием ДНК-полимеразы и смеси дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов[460].

Совместное использование ДНК-полимеразы и полинуклеотидсоединяющего фермента позволило осуществить также первый синтез природной ДНК — ДНК фага ФХ174[193]. В этом случае в качестве матрицы для синтеза была использована природная однонитевая ДНК фага. С помощью ферментативной реакции получен двухспиральный комплекс, вновь синтезированная цепь которого содержала вместо остатков тимидина остатки 5-бром-2'-дезоксиуридина, поскольку в инкубационной смеси тимидин-5'-трифосфат был заменен на 5-бром-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфат. Комплементарные полинуклеотиды разделялись центрифугированием в градиенте плотности, и биосинтетический полинуклеотид вновь использовался как матрица в ферментативной реакции. Продукт реакции представлял собой полностью синтетический полинуклеотид, идентичный по всем исследованным характеристикам однонитевой ДНК фага ФХ174.

Олигорибонуклеотиды *. Для получения олигорибонуклеотидов, прежде всего тринуклеозиддифосфатов, предложен ряд фермента-

---

* Некоторые олигонуклеотиды наиболее удобно получать расщеплением соответствующих полимеров. Это относится к гомогенным олигорибонуклеотидам, легко получаемым кратковременным щелочным гидролизом соответствующих гомогенных полирибонуклеотидов, а также к олигорибонуклеотидам типа $(Xp)_nYp$, которые легко получить, расщепляя продукт полимеризации ppX и ppY (под действием полинуклеотидфосфорилазы) нуклеазой, специфичной к остатку Yp. (Здесь X и Y — остатки нуклеозидов.) Ряд ди-, три- и тетрануклеотидов может быть достаточно легко выделен из продуктов расщепления РНК под действием РНК-аз.

тивных методов. Их несомненным преимуществом перед химическими методами является относительная простота проведения реакции и отсутствие необходимости введения защитных групп.

Наиболее широкое распространение имеет синтез тринуклеозиддифосфатов с помощью рибонуклеаз. В качестве нуклеотидного компонента при таком синтезе необходимо использовать циклофосфат мононуклеотида, способного взаимодействовать с данным ферментом (о специфичности нуклеаз см. стр. 69—72), или олигонуклеотид, имеющий на 3′-конце остаток такого нуклеозид-2′,3′-циклофосфата; нуклеозидный компонент может иметь любую структуру. Так, с помощью гуанил-РНК-азы можно осуществить синтез тринуклеозиддифосфатов двух типов (X и Y — остатки нуклеозидов):

$$G{>}p + XpY \longrightarrow GpXpY$$

$$XpG{>}p + Y \longrightarrow XpGpY$$

При надлежащем подборе условий можно получать относительные высокие выходы динуклеозидмонофосфатов и тринуклеозиддифосфатов.

Удалось подобрать условия, в которых тринуклеозиддифосфаты являются основным продуктом, образующимся при реакции, катализируемой полинуклеотидфосфорилазой [461–463]; структура их однозначно определяется структурой добавленной затравки (динуклеозидмонофосфата) и структурой полимеризующегося нуклеозид-5′-дифосфата, например:

$$ApU + ppA \longrightarrow ApUpA + ApUpApA + ApUpApApA$$

Полирибонуклеотиды. Наиболее удобным методом синтеза гомополирибонуклеотидов является полимеризация нуклеозид-5′-дифосфатов, катализируемая полинуклеотидфосфорилазой. В зависимости от условий реакции удается получить полимеры с мол. весом от $3 \cdot 10^4$ до $2 \cdot 10^6$. Благодаря широкой специфичности фермента к структуре гетероциклического ядра таким путем получены гомополимеры не только нуклеотидов, являющихся основными компонентами РНК [464, 465], но и гомополимеры — производные редких компонентов, в частности полипсевдоуридиловая [466], полиинозиновая [464], поли-3-метил- и поли-5-метилуридиновые кислоты [467, 468], гомополимеры различных метилпроизводных цитидиловой [469] и адениловой кислот [470]. Удалось, далее, получить гомополимеры, содержащие остатки аналогов природных нуклеозидов, например 5-галоидуридина XCIII [471], 5-галоидцитидина XCIV [472], изоадено-

зина XCV [473], 2-аминоаденозина [474] и ряда других соединений.

XCIII XCIV XCV

Z= F,Cl,Br,I Z= Br,I

Используя в качестве затравок для реакции с высокоочищенной полинуклеотидфосфорилазой олигонуклеотид, являющийся производным другого нуклеотида, получают блок-полимеры типа $(pX)_n(pY)_m$. Например:

$$C(pC)_5 + n\text{ppA} \longrightarrow C(pC)_5(pA)_n \quad n = 10-100$$

В частности, когда затравка является динуклеозидмонофосфатом, образуется гомополинуклеотид, содержащий на 5′-конце специфический нуклеотидный триплет:

$$GpU + n\text{ppA} \longrightarrow GpU(pA)_n$$

Для получения гомополирибонуклеотидов может быть использована и реакция, катализируемая РНК-полимеразой. Как и в случае ДНК-полимеразы, в некоторых условиях может происходить синтез полимера без добавления матрицы; при этом из смеси аденозин-5′-трифосфата и уридин-5′-трифосфата образуется двухцепочечный комплекс гомополинуклеотидов [475], а из смеси цитидин-5′-трифосфата и инозин-5′-трифосфата — полимер с чередующимися мононуклеотидными звеньями [476].

$$n\text{pppA} + n\text{pppU} \xrightarrow[\text{без матрицы}]{\text{РНК-полимераза из } Azotobacter\ vinelandii} (pA)_n \cdot (pU)_n$$

$$n\text{pppC} + n\text{pppI} \xrightarrow[\text{без матрицы}]{\text{РНК-полимераза из } Azotobacter\ vinelandii} (pCpI)_n$$

Полиадениловая, полиуридиловая и полицитидловая кислоты могут быть получены при полимеризации, катализируемой РНК-полимеразой, в условиях «синтеза с повторением» (стр. 99). В качестве исходной матрицы могут быть использованы различные ДНК. Для получения полигуаниловой кислоты используют синтез на матрице полицитидиловой кислоты [477].

РНК-полимеразная реакция широко применяется для получения полирибонуклеотидов с чередующейся последовательностью

мономерных звеньев. В качестве матрицы могут быть использованы олигодезоксирибонуклеотиды с определенной последовательностью, полученные химическим синтезом[478, 479]; полимеры более высокого молекулярного веса образуются при применении в качестве затравки полидезоксирибонуклеотидов с повторяющейся последовательностью ди-, три- и тетрануклеозидных звеньев. Например[480]:

$$n\text{pppA} + n\text{pppG} \xrightarrow[\text{d(pTpC)}_n\cdot\text{d(pApG)}_n]{\text{РНК-полимераза}} (\text{pApG})_n$$

$$n\text{pppU} + n\text{pppC} \xrightarrow[\text{d(pTpC)}_n\cdot\text{d(pApG)}_n]{\text{РНК-полимераза}} (\text{pUpC})_n$$

В присутствии РНК-полимеразы могут образовываться полимеры, содержащие остатки редких компонентов РНК, в частности дигидроуридина[481] (полимер этого соединения не может быть получен с полинуклеотидфосфорилазой), и аналогов основных компонентов РНК, например 5-бромуридина[482]. Таким путем могут быть получены также полимеры нуклеозидных антибиотиков — туберцидина[483] и формицина[484] — аналогов аденозина.

При полимеризации смеси нуклеозиддифосфатов под действием полинуклеотидфосфорилазы образуются полинуклеотиды, в которых распределение различных мономерных единиц близко к статистическому. Задача получения полирибонуклеотидов известного строения со специфической нуклеотидной последовательностью пока не решена, хотя возможность получения таких соединений с помощью РНК-полимеразной реакции с использованием в качестве матрицы соответствующих полидезоксирибонуклеотидов не вызывает сомнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пирс Э., Гистохимия, Издатинлит, 1962, стр. 171.
2. Свифт Х., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Чаргаффа Э., Дэвидсона Д., Издатинлит, 1957, стр. 388.
3. Зеленин А. В., Люминесцентная гистохимия нуклеиновых кислот, Изд. «Наука», 1967.
4. Шапот В. С., Нуклеазы, Изд. «Медицина», 1968.
5. Дише З., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Чаргаффа Э., Дэвидсона Д., Издатинлит, 1957, стр 548.
6. Кирби К. С., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Дэвидсона Д., Кона В., Изд. «Мир», 1966, стр. 10.
7. Josse J., Eigner J., Ann. Rev. Biochem., 35, 789 (1966).
8. Kirby K. S., Ulbricht T. L. V., Ann. Repts Progr. Chem., 63, 536 (1966).
9. Kirby K. S., Biochem. J., 66, 495 (1957); 70, 206 (1958).
10. Kay E. R. M., Simmons N. S., Dounce A. L., J. Am. Chem. Soc., 74, 1724 (1952).
11. Sevag M. G., Lackman D. B., Smolens J., J. Biol. Chem., 124, 425 (1938).

12. Marmur J., in «Methods in Enzymology», v. 6. Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1963, p. 726; J. Mol. Biol., 3, 208 (1961).
13. Massie H. R., Zimm B. H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 1636 (1965).
14. Davison P. F., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 45, 1560 (1959).
15. Davison P. F., Nature, 185, 918 (1960).
16. Thomas C. A., McHattie L. A., Ann. Rev. Biochem., 36, 485 (1967).
17. Edwards P. A., Shooter K. V., Quarth. Rev., 19, 369 (1965).
18. Smith H. O., Levine M., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 557
19. Doty P., McGill B. B., Rice S. A., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 44, 432 (1958).
20. Rubinstein I., Thomas C. A., Hershey A. D., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47, 1113 (1961).
21. Burgi E., Hershey A. D., Biophys. J., 3, 309 (1963).
22. Studier F. W., J. Mol. Biol., 11, 373 (1965).
23. Eigner J., Doty P., J. Mol. Biol., 12, 549 (1965).
24. Crothers D. M., Zimm B. H., J. Mol. Biol., 12, 525 (1965).
25. Kleinschmidt A. K., Lang D., Jacherts D., Zahn R. K., Biochim. Biophys. Acta, 61, 857 (1962).
26. Kleinschmidt A. K., Naturwiss., 54, 417 (1967).
27. Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., 5, 109 (1962).
28. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., 4, 430 (1962).
29. Vinograd J., Hearst J. E., Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe, 20, 372 (1962).
30. Sueoka N., Cheng T. Y., J. Mol. Biol., 4, 161 (1962).
31. Main R. K., Wilkins M. J., Cole L. J., J. Am. Chem. Soc., 81, 6490 (1959); Bernardi G., Biochim. Biophys. Acta, 174, 423 (1969).
32. Albert B. M., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 566.
33. Синсхеймер Р., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Чаргаффа Э., Дэвидсона Д., Издатинлит, 1962, стр. 156.
34. Гендон Ю. З., в кн. «Вирусология и иммунология», под ред. Зильбера Л. А., Изд. «Наука», 1964, стр. 36.
35. Cohen J. A., Science, 158, 343 (1967).
36. Cohen J. A., Bull. Soc. chim. biol., 50, 293 (1968).
37. Thomas C. A., Abelson J., in «Procedures in Nucleic Acid Research», Cantoni G. L., Davies D. R. (eds), Harper and Row Co., N. Y.—L., 1966, p. 553.
38. Freifelder D., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, L. Grossman, K. Moldave (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 550.
39. Sinsheimer R. L., in «Procedures in Nucleic Acid Research» Cantoni G. L., Davies D. R. (eds), Harper and Row Co., N. Y.—L., 1966, p. 569.
40. Спирин А. С., Усп. биол. хим., 4, 93 (1962).
41. Тихоненко Т. И., в кн. «Биосинтез белка и нуклеиновых кислот», под ред. Спирина А. С., Изд. «Наука», 1965, стр. 193.
42. Kit S., Ann. Rev. Biochem., 32, 43 (1963).
43. Руководство по цитологии, под ред. Жинкина Л. Н., Румянцева П. П., т. I, Изд. «Наука», 1965, стр. 355.
44. Cairns J., J. Mol. Biol., 6, 208 (1963).
45. Berns K. I., Thomas C. A., J. Mol. Biol., 11, 476 (1965).
46. MacHattie L. A., Berns K. I., Thomas C. A., J. Mol. Biol., 11, 648 (1965).
47. Safert E., Venner H., Z. physiol. Chem., 344, 278 (1966).
48. Pitout M. J., Maré I. J., Nature, 215, 1187 (1967).
49. Lehman I. R., J. Biol. Chem., 235, 1479 (1960).
50. Miura K., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press., N. Y. — L., 1967, p. 543.

51. Falkow S., Citarella R. V., J. Mol. Biol., 12, 138 (1965).
52. Roth T. F., Helinski D. R., Proc Nat Sci US, 58, 650 (1967).
53. Hikson P. T., Roth T. F., Proc. Nat. Acad. Sci US, 58, 1731 (1967).
54. Cozzarelli N. R., Kelly R B., Kornberg A., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 60, 922 (1968).
55. Freifelder D. R., Freifelder D., J. Mol Biol., 32, 25 (1968).
56. Кроленок С. А., Черноградская И А., в кн. «Руководство по цитологии», под ред. Вахтина Ю Б., т. 2, Изд «Наука», 1966, стр 280
57. Тэйлор Дж. Г., в кн. «Молекулярная генетика», под ред. Тэйлора Дж. Г., ч. 1, Изд. «Мир», 1964, стр. 78.
58. Huberman J. A., Riggs A. D., Proc. Nat Acad. Sci. US, 55, 599 (1966).
59. Sasaki M. S., Norman A., Exptl Cell Res., 44, 642 (1966).
60. Zamenhof S., in «Methods in Enzymology», v. 3, Collowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1957, p. 696.
61. Kidson C., J. Mol Biol., 17, 1 (1966).
62. Sakabe K., Okazaki R., Biochim. Biophys. Acta, 129, 651 (1966).
63. Oishi M., Proc Nat Acad Sci. US, 60, 329 (1968).
64. Holoubek V., Anal Biochem., 18, 375 (1967).
65. Levis A. G., Krsmanovic V., Miller-Faures A., Errera M., Europ. J. Biochem., 3, 57 (1967).
66. Kit S., J. Mol Biol., 3, 711 (1961)
67. Cheng T. Y., Sueoka N., Science, 141, 1194 (1963)
68. Borst P., Ruttenberg G. J. C. M., Biochim. Biophys. Acta, 114, 647 (1966)
69. Flamm W. G., Bond H. E., Burr H. E., Bond S. B., Biochim. Biophys. Acta, 123, 652 (1966).
70. Bond H. E., Flamm W. G., Burr H. E., Bond S. B., J. Mol. Biol., 27, 289 (1967).
71. Sueoka N., J. Mol Biol., 3, 31 (1961).
72. Sueoka N., Cheng T. Y., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 48, 1851 (1962), J. Mol. Biol., 4, 161 (1962).
73. Klett R P., Smith M., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad Press, N Y.—L, 1967, p. 554.
74. Warring M., Britten R J., Science, 154, 794 (1966).
75 Шмерлинг Ж. Г., Усп совр биол., 59, 33 (1965)
76. Granick S, Gibor A., Progr Nucl. Acid Res., 6, 143 (1967).
77. Iwamura T., Progr Nucl. Acid Res., 5, 133 (1966).
78. Rabinowitz M., Bull Soc. chim. biol., 50, 311 (1968).
79. Roels H., Intern. Rev. Cytol., 19, 1 (1966)
80. Luck D. J., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 49, 223 (1963); Luck D. J., Reich E., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 52, 931 (1964).
81. Rabinowitz M., Singlair J. H., DeSalle L., Haselkorn R., Swift H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 53, 1126 (1965).
82. Kafl G. F., Créce M. A., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 533.
83. David I. B., Wolstenholme D. B., J. Mol. Biol., 28, 233 (1967).
84. Fukuhara U., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 1065 (1967).
85 Nass M. M. K., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 56, 1215 (1966).
86. Kroon A. M., Borst P, Van Briggen E. F. J., Ruttenberg G. J. C. M., Proc. Nat. Acad Sci. US, 56, 1836 (1966)
87. Singlair J. H., Stevens B. J., Gross N., Rabinowitz M., Biochim. Biophys Acta, 145, 528 (1967).
88. Naas M., Naas S., J. Cell. Biol., 19, 593 (1963).
89. Chun E. H. L., Voughan M. H., Rich A., J. Mol. Biol., 7, 130 (1963).
90. Eisenstadt J. M., Brawerman G., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 541.
91. Richards O. C., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 156 (1967).

92. Kirby K. S., Biochim. Biophys. Acta, 55, 545 (1962); Biochem. J., 96, 266 (1965).
93. Hiatt H. H., J. Mol. Biol., 5, 217 (1962).
94. Midgley J. E. M., Biochim. Biophys. Acta, 108, 358 (1965).
95. Scherrer K., Darnell S. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 7, 486 (1962).
96. Britton R. J., Roberts R. B., Science, 131, 32 (1960).
97. McConkey E. H., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y. — L., 1967, p. 620.
98. Mandell J. D., Hershey A. D., Anal. Biochem., 1, 66 (1960).
99. Murakami T., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press., N. Y. — L., 1967, p. 634.
100. Tsanev R., Biochim. Biophys. Acta, 103, 374 (1965).
101. Richards E. G., Coll J. A., Gratzer W. B., Anal. Biochem., 12, 452 (1965).
102. Loening V. E., Biochem. J., 102, 251 (1967).
103. Bishop D. H. L., Claybrook J. R., Spiegelman S., J. Mol. Biol., 26, 373 (1967).
104. Himmel J. P., Anderson B. S., Arch. Biochem. Biophys., 112, 443 (1965).
105. Kurland C. G., J. Mol. Biol., 2, 83 (1960).
106. Maeda A., J. Biochem., 50, 377 (1961).
107. Спирин А. С., Биохимия, 26, 511 (1961).
108. Hadjiolov A. A., Venkov P. V., Tsanev R. G., Anal. Biochem., 17, 263 (1966).
109. Шустер Г., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Чаргаффа Э., Дэвидсона Д., Издатинлит, 1962, стр. 205.
110. Маркхем Р., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1966, стр. 73.
111. Weissman C., Ochoa S., Progr. Nucl. Acid. Res., 6, 353 (1967).
112. Wittmann H. G., Scholtissek C., Ann. Rev. Biochem., 35, 299 (1966).
113. Girard M., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y. — L., 1967, p. 581.
114. Fraenkel-Conrat H., in «Procedures in Nucleic Acid Res.», Cantoni G. L., Davies D. R. (eds), Harper and Row, N. Y. — L., 1966, p. 480.
115. Summers D. F., ibid., p. 488.
116. Comatos P. J., ibid., p. 493.
117. Mills D., Bishop D. H. L., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 60, 713 (1968).
118. Comatos P. J., Tamm I., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 49, 707 (1963).
119. Tomita K. L., Rich A., Nature, 201, 1160 (1964).
120. Sato T., Kyoguko Y., Higuchi S., Mitsui Y., Iitaka Y., Tsuboi M., Miura K., J. Mol. Biol., 16, 180 (1966).
121. Hofschneider P. H., Ammann J., Francke B., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 613.
122. Спирин А. С., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 341.
123. Богданов А. А., Шакулов А. С., в кн. «Биосинтез белка и нуклеиновых кислот», под ред. Спирина А. С., Изд. «Наука», 1965, стр. 86.
124. Питерман М., Физические и химические свойства рибосом, Изд. «Мир», 1967.
125. Спирин А. С., Гаврилова Л. П., Рибосома, Изд. «Наука», 1968.
126. Moldave K., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y. — L., 1967, p. 607.
127. Bolton E. L., in «Procedures in Nucleic Acid Research», Cantoni G. L., Davies D. R. (eds), Harper and Row, N. Y. — L., 1966, p. 437.

128. Barlow J., Mathias A. P., in «Procedures in Nucleic Acid Research», Cantoni G. L., Davies D. R. (eds), Harper and Row, N. Y. — L., 1966, p. 444.
129. Rosset R., Montier R., Julien J., Bull. Soc. chim. biol., 46, 87 (1964).
130. Comb D. G., Zehavi-Willner T., J. Mol. Biol., 23, 441 (1967).
131. Brown G. L., Progr. Nucl. Acid Res., 2, 259 (1963).
132. Баев А. А., в кн. «Биосинтез белка и нуклеиновых кислот», под ред. Спирина А. С., Изд. «Наука», 1965, стр. 50.
133. Баев А. А., Усп. биол. хим., 7, 67 (1965).
134. Tanaka K., in «Procedures in Nucleic Acid Research», Cantoni C. L., Davies D. R. (eds), Harper and Row, N. Y. — L., 1966, p. 466.
135. Apgar J., Holley R. W., Merrill S. H., J. Biol. Chem., 237, 796 (1962).
136. Холли Р., Апгар Д., Эверетт Г., Медисон Д., Меррил С., Замир А., в сб. «Синтез и структура нуклеиновых кислот», под ред. Варшавского Я. М., Изд. «Мир», 1966, стр. 94.
137. Tada M., Schweiger M., Zachau H. G., Z. physiol. Chem., 328, 85 (1962).
138. Doctor B. P., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K., (eds), Acad. Press, N. Y. — L., 1967 p. 664.
139. Bock R. M., Cherayil J. D., ibid., p. 638.
140. Bergquist P. L., Bagulev B. C., Ralph R. K., ibid., p. 660.
141. Sueoka N., Yamane T., ibid., p. 658.
142. Stern R., Littauer U. Z., Biochemistry, 7, 3469 (1968).
143. Gillam I., Millward S., Blew D., von Tigerstorm M., Wimmer E., Tener G. M., Biochemistry, 6, 3043 (1967).
144. Kelmers A. D., Novelli G. D., Stubberg M. P., J. Biol. Chem., 240, 3979 (1965).
145. Weiss J. F., Kelmers A. D., Biochemistry, 6, 2507 (1967); Weiss J. F., Pearson R. L., Kelmers A. D., Biochemistry, 7, 3479 (1968).
146. Zamecnick P. C., Stephenson M. L., Scott J. F., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 46, 811 (1960).
147. Stephenson M. L., Zamecnick P. C., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47, 1627 (1961).
148. Stephenson M. L., Zamecnick P. C., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K., (eds), Acad. Press, N. Y. — L., 1967, p. 670.
149. Грачев М. А., Мензорова Н. И., Сандакчиев Л. С., Будовский Э. И., Кнорре Д. Г., Биохимия, 31, 840 (1966).
150. Mehler A. H., Bank A., J. Biol. Chem., 238, 2888 (1963).
151. Simon S., Littauer U. Z., Katchalski E., Biochim. Biophys. Acta, 80, 169 (1964).
152. Gillam I., Blew D., Warrington R. C., von Tigerstrom M., Tener G. M., Biochemistry, 7, 3459 (1968).
153. Гаррис Г., в сб. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1966, стр. 215.
154. Овчинников Л. П., Усп. биол. хим., 9, 3 (1968).
155. Georgiev G. P., Progr. Nucl. Acid Res., 6, 259 (1967).
156. Hadjiolov A. A., Progr. Nucl. Acid Res., 7, 196 (1967).
157. Perry R. P., Progr. Nucl. Acid Res., 6, 219 (1967).
158. Weinberg R. A., Loening U., Willems A., Penman S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 1088 (1967).
159. Газарян К. Г., Шуппе Н. Г., Прокошкин Б. Д., Биохимия, 31, 108 (1966).
160. Лерман М. И., Владимирцева Е. А., Терских В. В., Георгиев Г. П., Биохимия, 30, 375 (1965).
161. Bautz E. K. F., J. Mol. Biol., 17, 298 (1966).
162. Scherrer K., Marcaud L., Zajdela F., Breckenridge B., Cros F., Bull. Soc. chim. biol., 48, 1037 (1966).

163. Soeiro R., Birnboim C., Darnell J., J. Mol. Biol., 19, 362 (1966).
164. Huang R. C., Bonner J., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 960 (1965).
165. Benjamin W., Levander O. A., Gellhorn A., DeBellis R. H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 55, 858 (1966).
166. Bonner J., Widholm J., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 1379 (1967).
167. Липман Ф., в сб. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 155.
168. Басс И. А., Гвоздев В. А., в кн. «Биосинтез белка и нуклеиновых кислот», под ред. Спирина А. С., Изд. «Наука», 1965, стр. 50.
169. Singer M. F., Leder P., Ann. Rev. Biochem., 35, 195 (1966).
170. Chantreune H., Burny A., Marbaix G., Progr. Nucl. Acid Res., 7, 173 (1967).
171. Shapot V., Pitot H. C., Biochim. Biophys. Acta, 119, 37 (1966).
172. Rodionova N. P., Shapot V. S., Biochim. Biophys. Acta, 129, 206 (1966).
173. Bergeron-Bouvet C., Moule Y., Biochim. Biophys. Acta, 123, 617 (1966).
174. King H. W. S., Fitschen W., Biochim. Biophys. Acta, 155, 32 (1968).
175. Rogers P. J., Preston B. N., Titchener E. B., Linnam A. W., Biochem. Biophys. Res. Comm., 27, 405 (1967).
176. Rifkin M. R., Wood D. D., Luck D. J. D., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 1025 (1967).
177. Küntel H., Noss H., Nature, 215, 1340 (1967).
178. Barnett E., Brown D. H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 452 (1967).
179. Epler J. J., Barnett E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 328 (1967).
180. Buck C. A., Nass M. M. K., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 60, 1045 (1968).
181. Stuts E., Noll H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 774 (1967).
182. Phethean P. D., Jervis L., Hallway M., Biochem. J., 108, 25 (1968).
183. Brown D. M., Todd A. R., in «Nucleic Acids», v. 1, Chargaff, E., Davidson D., (eds), Acad. Press, N. Y. — L., 1955, p. 409.
184. Levene P. A., Simms H. S., J. Biol. Chem., 65, 519 (1925); 70, 327 (1927).
185. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 52.
186. Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., 73, 1537 (1951).
187. Dekker C. A., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1953, 947.
188. Cohn W. E., Volkin E., J. Biol. Chem., 203, 319 (1953).
189. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1953, 2040.
190. Heppel L. A., Whitfield P. R., Biochem. J., 60, 1 (1955).
191. Whitfield P. R., Heppel L. A., Markham R., Biochem. J., 60, 15 (1955).
192. IUPAC — IUB Combined Comission on Biochemical Nomenclature, Biochemistry, 5, 1445 (1966).
193. Goulian M., Kornberg A., Sinsheimer R. L., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 2321 (1967).
194. Spiegelman S., Haruna I., Holland I. B., Beaudreau G., Mills D., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 919 (1965).
195. Бендич А., Розенкранц Г., в сб. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 245.
196. Дрыгин Ю. Ф., Богданов А. А., Прокофьев М. А., Химия природных соединений, 1966, 218.
197. Ralph R. K., Young R. J., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 84, 1490 (1962).
198. RajBhandary U. L., Young R. J., Khorana H. G., J. Biol. Chem., 239, 3875 (1964).
199. Dulbecco R., Smith J. D., Biochim. Biophys. Acta, 39, 358 (1960).
200. Steinschneider A., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, 5, 2729 (1966).

201. Hunt J. A., Biochem. J., 95, 541 (1965).
202. RajBhandary U. L., J. Biol. Chem., 243, 556 (1968).
203. Stuart A., Khorana H. G., J. Biol. Chem., 239, 3885 (1964).
204. Novogrodsky A., Hurwitz J., J. Biol. Chem., 241, 2923 (1966).
205. Wu R., Kaiser A. D., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 170 (1967).
206. Weiss R., Richardson C. C., J. Mol. Biol., 23, 405 (1967).
207. Bishop D. H. L., Pace N. R., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 1790 (1967).
208. Roblin R., J. Mol. Biol., 31, 51 (1968).
209. De Wachter R., Verhassel J. P., Fiers W., Biochem. Biophys. Acta, 157, 195 (1968).
210. Watanabe M., August J. T., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 59, 513 (1968).
211. Clayton D. A., Vinograd J., Nature, 216, 652 (1967).
212. Hudson B., Vinograd J., Nature, 216, 647 (1967).
213. Pikó L., Blair D. J., Tyler A., Vinograd J., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 59, 838 (1968).
214. Hotta Y., Bassel A., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 53, 357 (1965).
215. Levene P. A., Bass L. W., Nucleic Acid, Chemical Catalog Co., N. Y., 1931.
216. Jordan D. O., Chemistry of the Nucleic Acids, Butterworth, L., 1960.
217. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966.
218. Венкстерн Т. В., Усп. биол. хим. 6, 3 (1964).
219. Hall R. H., Biochemistry, 4, 661 (1965)
220. Littlefield J. W., Dunn D. B., Biochem. J., 70, 642 (1958).
221. Hall R. H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 12, 361 (1963).
222. Lipsett M. N., J. Biol. Chem., 240, 3975 (1965).
223. Madison J. T., Holley R. W., Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 152 (1965).
224. Lis A. W., Passarge W. E., Arch. Biochem. Biophys., 114, 593 (1966).
225. Gray M. W., Lane B G., Biochemistry, 7, 3441 (1968).
226. Iwanami Y., Brown G. M., Arch. Biochem. Biophys., 124, 472 (1968).
227. Baczynsky L., Biemann K., Hall R. H., Sciene, 159, 1481 (1968).
228. Carbon J. A., Hung L., Jones D. S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 53, 979 (1965).
229. Carbon J. A., David H., Studier M. H., Science, 161, 1146 (1968).
230. Cohn W. E., J. Biol. Chem., 235, 1488 (1960).
231. Dunn D. B., Biochim. Biophys. Acta, 38, 176 (1960).
232. Cantoni G. L., Gelboin H. V., Luborsky S. W., Richards H. H., Biochim. Biophys. Acta, 61, 354 (1962).
233. RajBhandary U. L., Faulkner R. D., Stuart A., J. Biol., Chem., 243, 575 (1968).
234. Feldmann H., Dütting D., Zachau H. G., Z. physiol. Chem., 347, 236 (1966).
235. Gassen H. G., Witzel H., Biochim. Biophys. Acta, 95, 244 (1965).
236. Dunn D. B., Biochim. Biophys. Acta, 46, 198 (1961).
237. Hall R. H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 13, 394 (1963).
238. Biemann K., Tsunakawa S., Sonnenbichler J., Feldmann H., Dütting H., Zachau H. G., Angew. Chem., 78, 600 (1966).
239. Robins M. J., Hall R. H., Thedford R., Biochemistry, 6, 1837 (1967).
240. Hall R. H., Csonka L., David H., McLennan B., Science, 156, 69 (1967).
241. Harada F., Gross H. J., Kimura F., Chang S. H., Nishimura S., RajBhandary U. L., Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 299 (1968); Burrows W. J., Atmstrong D. J., Skoog F., Hecht S. M., Boyle J. T A., Leonard N. J., Occolowitz J., Science, 161, 691 (1968).
242. Hall R. H., Biochemistry, 3, 769 (1964).
243. Hall R. H., Chedda G. B., J. Biol. Chem., 240, PC 2754 (1965).

244. Smith J. B., Dunn D. B., Biochem. J., **72**, 294 (1959).
245. Dunn D. B., Biochem. J., **86**, 14p (1963).
246. Smith J. D., Dunn D. B., Biochim. Biophys. Acta, **31**, 573 (1959).
247. Hall R. H., Biochemistry, 3, 876 (1964).
248. Nichols J. L., Lane B. G., Canad. J. Biochem., 44, 1633 (1966); Biochim. Biophys. Acta, **166**, 605 (1968).
249. Wyatt G. R., Cohen S. S., Nature, **170**, 1072 (1952).
250. Lehman I. R., Pratt E. A., J. Biol. Chem., **235**, 3524 (1960).
251. Kuno S., Lehman I. R., J. Biol. Chem., **237**, 1266 (1962).
252. Kallen R. G., Simon M., Marmur J., J. Mol. Biol., **5**, 248 (1962).
253. Takahashi I., Marmur J., Nature, **197**, 794 (1963).
254. Ванюшин Б. Ф., Усп. совр. биол., **65**, 163 (1968).
255. Wyatt R. G., Biochem. J., **48**, 581 (1951).
256. Dunn D. B., Smith J. B., Biochem. J., **68**, 627 (1958).
257. Unger G., Venner H., Z. physiol. Chem., **344**, 280 (1966).
258. Bendich A., in «Methods in Enzymology», v. 3, Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Acad. Press, N. Y.—L.; 1957, p. 715.
259. Cohn W. E., in «Methods in Enzymology», v. 3, Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1957, p. 724.
260. Smith J. D., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K., (eds), Acad. Press. N. Y. — L., 1967, p. 350.
261. Markham R., in «Methods in Enzymology», v. 3, Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1957, p. 743.
262. Randerath K., Randerath E., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 323.
263. Будовский Э. И., Клебанова Л. М., Вопр. мед. хим., **13**, 299 (1967).
264. Chargaff E., Experientia, **6**, 201 (1950).
265. Белозерский А. Н., Спирин А. С., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Чаргаффа Э., Дэвидсона Д., Издатинлит, 1962, стр. 123.
266. Белозерский А. Н., Труды V Международного биохимического конгресса, симпозиум III, Изд. АН СССР, 1962, стр. 123.
267. Антонов А. С., Усп. совр. биол., **60**, 161 (1965).
268. Elson D., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **17**, 367 (1955).
269. Hall B. D., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **47**, 137 (1961).
270. Bolton E. T., McCarthy J., Proc. Nat. Acad Sci. US, 48, 1390 (1962); J. Mol. Biol., **8**, 201 (1964).
271. Bautz E. K. F., Hall B. D., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **48**, 400 (1962).
272. Strack H. B., Kaiser A. D., J. Mol. Biol., **12**, 36 (1965).
273. MacHattie L. A., Ritchie D. S., Thomas C. A., Richardson C. C., J. Mol. Biol., **23**, 355 (1967).
274. Abelson J., Thomas C. A., J. Mol. Biol., **18**, 262 (1966).
275. Josse J., Kaiser A. D., Kornberg A., J. Biol. Chem., **236**, 864 (1961).
276. Weiss S. B., Nakamoto T., Proc. Nat. Acad Sci. US, **47**, 1400 (1961).
277. Hurwitz J., Furth J. J., Andrews M., Evans A., J. Biol. Chem., 237, 3752 (1962).
278. Баев А. А., в кн. Шапота В. С. «Нуклеазы», Изд. «Медицина», 1968, стр. 164.
279. RajBhandary U. L., Stuart A., Ann. Rev. Biochem., **35**, 759 (1966).
280. Burton K., in «Essays in Biochemistry», v. **1**, Campbell P. N., Greville D., (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1965 p. 57.
281. Schütt M., Z. Chem., **8**, 12 (1968).
282. Whitfield P., Biochem. J., **58**, 390 (1954).
283. Brown D. M., Fried M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 2206.
284. Yu C.-T., Zamecnik P. C., Biochim. Biophys. Acta, **45**, 148 (1960).
285. Neu H. C., Heppel L. A., J. Biol. Chem., **239**, 2927 (1964).
286. Whitfeld P., Biochim. Biophys. Acta, **108**, 202 (1965).
287. Steinschneider A., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, **5**, 2735 (1966).

288. Weith H. L., Gilham P. T., J. Am. Chem. Soc., 89, 5473 (1967).
289. Moss G. P., Reese C. B., Schofield K., Shapiro R. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1963, 1149.
290. Gabriel T., Nussbaum A. L., Abstr. Papers of XXIst Intern. Congress Pure Appl. Chem., Nucleic Acid Components, Prague, 1967, № 51; Gabriel T., Chen W. Y., Nussbaum A. L., J. Am. Chem. Soc., 90, 6833 (1968).
291. Holley R. W., Madison J. T., Zamir A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 17, 389 (1964).
292. Василенко С. К., Демушкин В. П., Будовский Э. И., Кнорре Д. Г., ДАН СССР, 162, 694 (1965).
293. Bayley C. R., Brammer K. W., Jones A. S., J. Chem. Soc., 1961, 1903.
294. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 195, 49 (1952).
295. Jones A. S., Tittensor J. R., Walker R. T., Nature, 209, 296 (1966).
296. Takemura S., Biochim Biophys. Acta, 29, 447 (1958); Bull. Chem. Soc. Japan, 32, 920 (1959).
297. Chargaff E., Shapiro H. S., Biochemistry, 5, 3012 (1966).
298. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Turchinsky M. F., Simukova N. A., Biochem. Biophys Res. Comm., 19, 49 (1965).
299. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Demushkin V. P., Turchinsky M. F., Simukova N. A., Sverdlov E. D., Biochim. Biophys. Acta, 142, 35 (1967).
300. Beers K. T., J. Biol. Chem., 235, 2393 (1960).
301. Москвитина Т. А., Будовский Э. И., ДАН СССР, 171, 999 (1966).
302. Witzel H., Progress in Nucleic Acid Res., v. 2, Acad. Press, N. Y.—L., 1963, p. 221.
303. Gassen G. H., Witzel H., Europ. J. Biochem., 1, 36 (1967).
304. Эгами Ф., Такасахи К., Усида Ц., в сб. «Нуклеиновые кислоты», под ред Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1966, стр. 144.
305. Татарская Р. И., Абросимова-Амельянчик Н. М., Аксельрод В. Д., Кореняко А. И., Венкстерн Т. В., Мирзабеков А. Д., Баев А. А., ДАН СССР, 157, 725 (1964); Татарская Р. И., Абросимова-Амельянчик Н. М., Аксельрод В. Д., Кореняко А. И., Ниедра Н. Я., Баев А. А., Биохимия, 31, 1017 (1966).
306. Lee J. C., Ho N. W. Y., Gilham P. T., Biochim. Biophys. Acta, 95, 503 (1965).
307. Иванова О. И., Кнорре Д. Г., Малыгин Э. Г., Мол. биол., 1, 335 (1967).
308. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Турчинский М. Ф., Демушкин В. П., ДАН СССР, 152, 1005 (1963).
309. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Broude N. E., Klebanova L. M., Biochim. Biophys. Acta, 134, 492 (1967).
310. Goldstein J., J. Mol. Biol., 25, 23 (1967).
311. Штэелин М., в сб. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В. и Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1966, стр. 44.
312. Laskowski M., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K., (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 281.
313. Furlong N. B., ibid., p. 318.
314. Sanger F., Brownlee G. G., ibid., p. 361.
315. Miura K., Hayashi Y., ibid., p. 390.
316. Rushizky G. W., ibid., p. 295.
317. Tener G. M., ibid., p. 398.
318. Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisee M., Merril S. H., Penswick J. H., Zamir A., Science, 147, 1462 (1965); русск. пер. в сб. «Синтез и структура нуклеиновых кислот», под ред. Варшавского Я. М., Изд. «Мир», 1966, стр. 128.
319. Penswick J. P., Holley R. W., Proc. Nat. Acad. Sci. US 53, 543 (1965).

320. Zachau H. G., Dütting D., Feldman H., Z. physiol. Chem., 347, 212 (1966).
321. Madison J. T., Everett G. A., Kung H., Science, 153, 531 (1966).
322. Баев А. А., Венкстерн Т. В., Мирзабеков А. Д., Крутилина А. И., Ли Л., Аксельрод В. Д., Мол. биол., 1, 754 (1967).
323. RajBhandary U. L., Chang S. H., Stuart A., Faulkner R. D., Hoskinson R. M., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 751 (1967).
324. Goodman H. M., Abelson J., Landy A., Brenners S., Smith J. D., Nature, 217, 1019 (1968).
325. Dube S. K. Marcker K. A., Clark B. F. C., Cory S., Nature, 218, 232 (1968).
326. Takemura S., Mizutani T., Miyazaki M., J. Biochem., 63, 227 (1968).
327. Staehelin M., Rogg H., Baguley B. C., Ginsberg T., Wehrli W., Nature, 219, 1363 (1968).
328. Forget B. G., Weissman S. H., Science, 158, 1695 (1967); J. Biol. Chem., 244, 3148 (1969).
329. Brownlee G. G., Sanger F., Barrell B. G., Nature, 215, 735 (1967); J. Mol. Biol., 34, 379 (1968).
330. Sugiura M., Takanami M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 1595 (1967).
331. Takanami M., J. Mol. Biol., 23, 135 (1967); 29, 323 (1967).
332. Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. G., J. Mol. Biol. 13, 373 (1965).
333. Delihas N., Biochemistry, 6, 3356 (1967).
334. Gound H. J., J. Mol. Biol., 29, 307 (1967).
335. Mandelles S., J. Biol. Chem., 242, 3103 (1967).
336. de Wachter R., Fiers W., J. Mol. Biol., 30, 507 (1967).
337. Bishop D. L. H., Miles D. R., Spiegelman S., Biochemistry, 7, 3744 (1968).
338. Mandeles S., J. Biol. Chem., 243, 3671 (1968).
339. May D. S., Knight C. A., Virology, 25, 502 (1965).
340. Shapiro H. S., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1967, p. 205.
341. Burton K., ibid., p. 222.
342. Shapiro H. S. ibid., p. 212.
343. Lunt M. R., Burton K., Biochim. Biophys. Acta, 55, 1005 (1962).
344. Brown D. D., Weber C. S., J. Mol. Biol., 34, 661, 681 (1968).
345. Корана Г., Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты, Изд. «Мир», 1964.
346. Женодарова С. М., Усп. хим. 34, 82 (1965).
347. Женодарова С. М., Хабарова М. И., Усп. хим., 35, 1265 (1966).
348. Cramer F., Angew. Chem., 78, 186 (1966).
349. Khorana H. G., Vizsolyi J. P., Ralph R. K., J. Am. Chem. Soc., 84, 414 (1962).
350. Jacob T. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 86, 1630 (1964).
351. Gilham P. T., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 80, 6212 (1958).
352. Lohrmann R., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 88, 829 (1966).
353. Wiemann G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 84, 4329 (1962).
354. Letsinger R. L., Ogilvie K. K., J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); Letsinger R. L., Ogilvie K. K., J. Am. Chem. Soc., 91, 3350 (1969); Letsinger R. L., Ogilvie K. K., Miller P. S., J. Am. Chem. Soc., 91, 3360 (1969).
355. Eckstein F., Rizk I., Angew. Chem., 79, 684, 939 (1967); Chem. Ber., 102, 2362 (1969).
356. Letsinger R. L., Mahadevan V., J. Am. Chem. Soc., 87, 3526 (1965); 88, 5319 (1966).

357. Cramer F., Hellig R., Hettler H., Scheit K. H., Seliger H., Angew. Chem., 78, 640 (1966).
358. Hayatsu H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 88, 3182 (1966); 89, 3881 (1967).
359. Melby L. R., Strobach D. R., J. Am. Chem. Soc., 89, 450 (1967).
360. Blackburn G. M., Brown M. J., Harris M. R., J. Chem. Soc., C, 1967, 2438.
361. Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H., J. Am. Chem. Soc., 80, 6223 (1958).
362. Khorana H. G., Vizsolyi J. P., J. Am. Chem. Soc., 83, 675 (1961).
363. Talahashi A., Adler J., Khorana H. G., J. Biol. Chem., 238, 3080 (1963).
364. Khorana H. G., Turner A. F., Vizsolyi J. P., J. Am. Chem. Soc., 83, 686 (1961).
365. Ralph R. K., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 83, 2926 (1961).
366. Ralph R. K., Connors W. J., Schaller H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 1983 (1963).
367. Turner A. F., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 81, 4651 (1959).
368. Ohtsuka E., Moon M. W., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 87, 2956 (1965).
369. Wiemann G., Schaller H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 3835 (1963).
370. Narang S. A., Jacob T. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 89, 2167 (1967).
371. Cramer F., Frölke W., Matzura H., Angew. Chem., 79, 580 (1967).
372. Jacob T. M., Narang S. A., Khorana H. G., J. Am. Chem., Soc., 89, 2177 (1967).
373. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1955, 2632.
374. Jacob T. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 87, 368 (1965).
375. Jacob T. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 87, 2971 (1965).
376. Narang S. A., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 87, 2981 (1965).
377. Narang S. A., Jacob T. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 87, 2988 (1965).
378. Kösell H., Büchi H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 89, 2185 (1967).
379. Letsinger R. L., Caruthers M. H., Jerina D. M., Biochemistry, 6, 1379 (1967).
380. Letsinger R. L., Caruthers M. H., Miller P. S., Ogilvie K. K., J. Am. Chem. Soc., 89, 7146 (1967).
381. Kössel H., Moon M. W., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 89, 2148 (1967).
382. Ohtsuka E., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 89, 2195 (1967).
383. Schaller H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 3828, 3841 (1963).
384. Weimann G., Schaller H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 3835 (1963).
385. Ohtsuka E., Moon M. W., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 87, 2956 (1965).
386. Eckstein F., Chem. Ber., 100, 2236 (1967).
387. Franke A., Eckstein F., Scheit K. H., Cramer F., Chem. Ber., 101, 944 (1968).
388. Kathawala F., Cramer F., Ann., 709, 185 (1967).
389. Kathawala F., Cramer F., Ann., 712, 195 (1968).
390. Narang S. A., Dheer S. K., Michniewicz, J. Am. Chem. Soc., 90, 2702 (1968).
391. Lohrmann R., Söll D., Hayatsu H., Ohtsuka E., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 88, 819 (1966).
392. Holý A., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., 31, 3800 (1966).

393. Lapidot Y., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 3852 (1963).
394 Smrt J, Coll Czech Chem Comm., 29, 2049 (1961); Smrt J., Sorm F., Coll Czech Chem Comm 29, 2971 (1964)
395. Coutsogeorgopoulos C., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 86, 2926 (1964).
396. Smith M., Rammler D H., Goldberg I. H., Khorana H G., J. Am. Chem Soc., 84, 130 (1962)
397. Cramer F., Rhaese H.-J., Rittner S., Scheit K. H., Ann., 683, 199 (1965).
398. Smrt J., Šorm F., Coll. Czech Chem. Comm., 27, 73 (1962); 28, 61 (1963).
399. Chladek S., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., 29, 214 (1964)
400. Rammler D. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 84, 3112 (1962).
401. Zemlička J., Chladek S., Holý A., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., 31, 3198 (1966).
402. Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., 33, 1462 (1968).
403. Holý A., Coll. Czech. Chem. Comm., 33, 223 (1968).
404 Söll D., Khorana H. G, J. Am. Chem. Soc., 87, 360 (1965).
405 Cramer F., Scheit K. H., Rhaese H. J., Ann., 693, 244 (1966).
406. Тихомирова-Сидорова Н. С., Кавуненко А. П., Пяйвинен Э. А., ЖОХ, 37, 1923 (1967).
407. Söll D., Khorana H G., J. Am. Chem. Soc., 87, 350 (1965).
408. Smrt J., Sorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., 28, 2415 (1963).
409. Rhaese H J., Siehr W., Cramer F., Ann., 703, 215 (1967).
410. Griffin B E., Jarman M., Reese C. B., Tetrahedron, 24, 639 (1968).
411. Griffin B. E., Reese C. B., Tetrahedron 24, 2537 (1968).
412. Heppel L. A., Whitfeld P. A., Biochem. J., 60, 1 (1955).
413. Heppel L. A., Whitfeld P. A., Markham R., Biochem. J., 60, 8 (1955).
414. Bernfield M. R., J. Biol. Chem., 241, 2014 (1966); 240, 4753 (1965)
415. Тихомирова Сидорова Н. С., Устюжанин Г. Е., Коган Э. М., ЖОХ, 36, 2219 (1966); Биохимия, 32, 867 (1967).
416. Sato-Asano K., Egami F., Biochim. Biophys. Acta, 29, 655 (1958); J Biochem. (Japan), 48, 284 (1960)
417. Hayashi H., Egami F., J. Biochem. Japan, 53, 176 (1963).
418. Scheit K. H., Cramer F., Tetrahedron Letters, 1964, 2975.
419. Grünberger D., Holý A., Šorm F., Coll. Czech. Chem Comm., 33, 286 (1968).
420. Абросимова-Амельянчик Н. М., Татарская Р. И., Баев А. А., Мол. биол., 1, 307 (1967).
421. Zhenodarova S. M., Sedelnikova E. M., Biochim. Biophys Acta, 169, 559 (1968).
422. Боллум Ф., в сб «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 9.
423. Keir H. M., Progr. Nucl Acid Res., 4, 82 (1965).
424 Elson D., Ann Rev Biochem, 34, 449 (1965).
Coutsogeorgopoulos C., Cannellanis E. S.,
425 Krakow J S,
Biochim Biophys Acta, 55, 639 (1962).
Biochim Biophys Acta, 68, 589 (1963).
426 Keir H M, Smith S M., Proc. Nat. Acad. Sci. US,
427 Bollum F J, Groeniger E., Yoneda M.,
51, 853 (1964).
«Биосинтез белка и нуклеиновых кислот», под ред.
428. Тонгур В. С., в кн.
Спирина А. С., Изд «Наука», 1965, стр 277.
«Нуклеиновые кислоты», под ред. Ко-
429 Грюнберг-Манаго М, в сб.
на В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 112.
430 Смелли Р., в сб. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 39.

431. Хервиц Дж., Огест Дж., в сб., «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 74.
432. Остерман Л. А., Усп. биол. хим., 7, 116 (1965).
433. Haruna I., Nozu K., Ohtaka Y., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 50, 905 (1963).
434. Haruna I., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 579 (1965).
435. Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 51, 682, 690 (1964).
436. Gellert M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 148 (1967).
437. Weiss B., Richardson C. C., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 1021 (1967).
438. Olivera B. M., Lehman I. R., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 1426 (1967).
439. Gupta N. K., Ohtsuka E., Weber H., Chang S. H., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 60, 285 (1968).
440. Hayes F. N., Mitchell V. E., Ratliff R. L., Williams D. L., Biochemistry, 6, 2488 (1967).
441. Bollum F. J., Groeniger E., Yoneda H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 51, 853 (1964).
442. Radding C. M., Josse J., Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 2869 (1962).
443. Richardson C. C., Schildkraut C. L., Aposhian H. V., Kornberg A., J. Biol. Chem., 239 (1964).
444. Inman R. B., Baldwin B. L., J. Mol. Biol., 8, 452 (1964).
445. Schachman H. K., Adler J., Radding C. M., Lehman I. R., Kornberg A., J. Biol. Chem., 235, 3242 (1960).
446. Lee-Huang S., Cavallieri L., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 51, 1022 (1964).
447. Riley M., Maling B., Chamberlin M. J., J. Mol. Biol. 20, 359 (1966).
448. Byrd C., Ohtsuka E., Moon M. W., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 53, 79 (1965).
449. Wells R. D., Blair J. E., J. Mol. Biol., 27, 273 (1967).
450. Wells R. D., Ohtsuka E., Khorana H. G., J. Mol. Biol., 14, 221 (1965).
451. Wells R. D., Jacob T. M., Narang S. A., Khorana H. G., J. Mol. Biol., 27, 237 (1967).
452. Wells R. D., Büchi H., Kösell H., Ohtsuka E., Khorana H. G., J. Mol. Biol., 27, 265 (1967).
453. Bessman M. J., Lehman I. R., Adler J., Zimmerman S. B., Simms E. S., Kornberg A., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 44, 633, (1958).
454. Chamberlin M., Baldwin R. L., Berg P., J. Mol. Biol., 7, 334 (1963).
455. Lezius A. G., Scheit K. H., Europ. J. Biochem., 3, 85 (1967).
456. Ratliff R. L., Hoard D. E., Ott D. G., Hayes F. N., Biochemistry, 6, 851 (1967).
457. Ratliff T. L., Schwartz A. W., Kerr V. N., Williams D. L., Ott D. G., Hayes F. N., Biochemistry, 7, 412 (1968).
458. Kato K., Concalves J. M., Houts G. E., Bollum F., J. Biol. Chem., 242, 2780 (1967).
459. Gupta N. K., Ohtsuka E., Sgaramella V., Buchi H., Kumar A., Weber H., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 60, 1338 (1968).
460. Gupta N. K., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 61, 215 (1969).
461. Thach R., Doty P., Science, 147, 1310 (1965); 148, 632 (1965).
462. Leder P., Singer M. F., Brimacombe R. C. L., Biochemistry, 4, 1561 (1965).
463. Bernfield M. R., Nirenberg M. W., Science, 147, 479 (1965).
464. Grunberg-Manago M., Ortiz P. J., Ochoa S., Biochim. Biophys. Acta, 20, 269 (1956).
465. Thang M. N., Graffe M., Grunberg-Manago M., Biochim. Biophys. Acta, 108, 125 (1965).

466. Pochon F., Michelson A. M., Grunberg-Manago M., Cohn W. E., Dondon L., Biochim. Biophys. Acta, 80, 441 (1964).
467. Griffin B. E., Todd A. R., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 44, 1123 (1958).
468. Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 8, 235 (1961).
469. Brimacombe R. L. C., Reese C. B., J. Mol. Biol., 18, 529 (1966).
470. Griffin B. E., Haslam W. J., Reese C. B., J. Mol. Biol., 10, 353 (1964).
471. Michelson A. M., Dondon J., Grunberg-Manago M., Biochim. Biophys. Acta, 55, 528 (1962).
472. Michelson A. M., Monny C., Biochim. Biophys. Acta, 149, 88 (1967).
473. Michelson A. M., Monny C., Laursen R. A., Leonard N. J., Biochim. Biophys. Acta, 119, 258 (1966).
474. Howard F. B., Frazier J., Miles H. T., J. Biol. Chem., 241, 4293 (1966).
475. Smith D. A., Ratliff R. L., Williams D. L., Martines A. M., J. Biol. Chem., 242, 590 (1967).
476. Krakow J. S., Karstadt M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 2094 (1967).
477. Haselkorn R., Fox C. F., J. Mol. Biol., 13, 780 (1965).
478. Melhotra B. D., Khorana H. G., J. Biol. Chem., 240, 1750 (1965).
479. Nishimura S., Jacob T. M., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 52, 1494 (1964).
480. Nishimura S., Jones D. S., Khorana H. G., J. Mol. Biol., 13, 302 (1965).
481. Roy-Burman P., Roy-Burman S., Biochim. Biophys. Acta, 142, 355 (1967).
482. Chamberlin M., Baldwin R. L., Berg P., J. Mol. Biol., 7, 334 (1963).
483. Nishimura S., Harada F., Ikehara M., Biochim. Biophys. Acta, 129, 301 (1966).
484. Ikehara M., Murao K., Harada F., Nishimura S., Biochim. Biophys. Acta, 155, 82 (1968).
485. Pene J. J., Knight E., Darnell J. E., J. Mol. Biol., 33, 609 (1968).
486. Weinberg R. A., Penman S., J. Mol. Biol., 38, 289 (1968).
487. Hodnett J. J., Bush H., J. Biol. Chem., 243, 6334 (1968).
488. Peacock A. C., Dingman C. W., Biochemistry, 6, 1818 (1967).
489. Dingman C. W., Peacock A. C., Biochemistry, 7, 659 (1968).
490. Nakamura T., Prestayko A. W., Buch H., J. Biol. Chem., 243, 1368 (1968).
491. Prestayko A. W., Busch H., Biochim. Biophys. Acta, 169, 327 (1968).
492. Jacobson R. A., Bonner J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 716 (1968).
493. Bernhardt D., Darnell J. E., J. Mol. Biol., 42, 43 (1969).
494. Munro H. M., Fleck A., Methods of Biochemical Analysis, 14, 113 (1966).
495. Тихоненко Т. И., Биохимия вирусов, Изд. «Медицина», 1966, стр. 53.
496. Strauss J. H., Kelly R. B., Sinsheimer R. L., Biopolymers, 6, 793 (1968).
497. Boedtker H., J. Mol. Biol., 35, 61 (1968).
498. Corneo C., Ginelli E., Soave C., Bernardi G., Biochemistry, 7, 4373 (1968).
499. Darnell J. E., Bacter. Rev., 32, 262 (1968).
500. Schweizer M. P., Chheda G. B., Banczynskyj L., Hall R. H., Biochemistry, 8, 3283 (1969).
501. Dütting D., Fortschr. Chem. Org. Naturst., 26, 356 (1968).
502. Madison J. T., Ann. Rev. Biochem., 37, 131 (1968).
503. Nass M. M. K., Science, 165, 25 (1969).
504. Wimmer E., Reichman M. E., Science, 160, 1452 (1968).
505. Merril R. C., Biopolymers, 6, 1727 (1968).
506. Cory S. Marcker K. A., Dube S. K., Clark B. F. C., Nature 220, 1039 (1968).

507. Barrell B. G., Sanger F., FEBS Letters, **3**, 275 (1969).
508. Yaniv M., Barrell B. G., Nature, **222**, 278 (1969).
509. Doctor B. P., Loebel J. E., Sodd M. S., Winter D. B., Science, **163**, 693 (1969).
510. Dudock B. S., Katz G., J. Biol. Chem., **244**, 3069 (1969); Dudock B. S., Katz G., Taylor E. K., Holley R. W., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **62**, 941 (1969).
511. Takemura S., Murakami M., Miyazaki M., J. Biochem. (Japan), **65**, 489, 553 (1969).
512. Hashimoto S., Miyazaki M., Takamura S., J. Biochem. (Japan), **65**, 659 (1969).
513. Amaldi F., Attardi G., J. Mol. Biol., **33**, 737 (1968).
514. Fellner P., Sanger F., Nature, **219**, 236 (1968).
515. Glitz D. G., Bradley A., Fraenkel-Conrat H., Biochim. Biophys. Acta, **161**, 1 (1968).
516. Dahlberg J. E., Nature, **220**, 548 (1968).
517. De Wachter R., Fiers W., Nature, **221**, 233 (1969).
518. Glitz D. G., Biochemistry, **7**, 927 (1968).
519. De Wacher R., Verhassel J. P., Fiers W., FEBS Letters, **1**, 93 (1968); Biochim. Biophys. Acta, **157**, 195 (1968).
520. Adams J. M., Jeppesen P. G. N., Sanger F., Barrell B. G., Nature, **223**, 1009 (1969).
521. Holley R. W., Progr. Nucl. Acid. Res., **8**, 37 (1968).
522. Zachau H. G., Angew. Chem., **81**, 645 (1969).
523. Blackburn G. M., Brown M. J., Harris M. R., Shire D., J. Chem. Soc., (C), **1969**, 676.
524. Cramer F., Köster H., Angew. Chem., **80**, 488 (1968).
525. Melby L. R., Strobach D. R., J. Org. Chem., **34**, 421, 427 (1969).

ГЛАВА 2

КОНФОРМАЦИЯ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ *

I. ВВЕДЕНИЕ

Понимание факторов, определяющих химическое поведение и биологическую специфичность нуклеиновых кислот, во многом зависит от информации о распределении электронной плотности и пространственном расположении различных структурных элементов этих соединений.

Как известно, вращение вокруг ординарных связей С—С, С—N, С—О и т. д. в органических соединениях не является полностью свободным, и из бесчисленного множества теоретически возможных конформаций реализуются лишь некоторые, характеризующиеся относительным минимумом потенциальной энергии. Устойчивость той или иной конформации молекулы зависит, с одной стороны, от ван-дер-ваальсовых сил отталкивания, возникающих между соседними ковалентно-несвязанными атомами, и, с другой стороны, от сил притяжения между различными функциональными группами за счет, например, диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей и т. д., которые вызывают их сближение. Качественное рассмотрение факторов, стабилизирующих данную конформацию, обычно можно провести на молекулярных моделях соединения. В ряде случаев это позволяет сделать довольно однозначные предсказания о наиболее устойчивой конформации данного соединения. В тех случаях, когда имеется ряд факторов, действующих в противоположных направлениях, количественная оценка устойчивости различных конформаций представляется достаточно сложной; вместе с тем имеются некоторые эмпирические закономерности, позволяющие в отдельных случаях выбирать наиболее устойчивую конформацию данного соединения.

Для определения конформации нуклеозидов и нуклеотидов, которые являются довольно сложными молекулами, имеют значение данные рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса и дисперсии оптического вращения.

---

* Обзор — см.: Преображенская Н. Н., Шабарова З. А., Усп. химии 38, 222 (1969).

Исследование картины дифракции рентгеновских лучей в кристалле данного соединения позволяет при благоприятных условиях локализовать положение атомов, входящих в состав этого соединения, с точностью, в лучших работах достигающей нескольких тысячных ангстрема, и определить тем самым конформацию молекулы в кристалле. Получение такой картины требует, однако, очень большой вычислительной работы, которая заметно упрощается, если в кристалле присутствует один или несколько атомов с большим атомным номером. Лишь немногие нуклеозиды и нуклеотиды исследованы пока с помощью рентгеноструктурного анализа; это связано помимо трудоемкости метода с существенным техническим ограничением — необходимостью иметь монокристалл вещества размером около 0,1 *мм*, получение которого в случае производных нуклеозидов и нуклеотидов может представлять значительные трудности *.

При использовании метода ЯМР ** наибольшую информацию о конформации молекулы получают обычно из величины $J_{1,2}$ — константы спин-спинового взаимодействия между двумя протонами, находящимися у соседних атомов углерода. Величина $J_{1,2}$ зависит в первую очередь от величины двугранного угла $\Phi_{1,2}$ между плоскостями C-1—C-2—H (при C-1) и C-1—C-2—H (при C-2), подчиняясь уравнению Карпласа:

$$J_{1,2} = J_0 \cos^2 \Phi_{1,2} - 0{,}28$$

Величина константы спин-спинового взаимодействия зависит, однако, и от других факторов: углов C-1—C-2—H (при C-2) (или C-2—C-1—H (при C-1), длины связи C-1—C-2 и электроотрицательности атомов, связанных с атомами углерода. Вследствие это-

---

* Подробнее о методе рентгеноструктурного анализа см.: Китайгородский А. Н., Теория структурного анализа, Изд. «Наука», 1957; Гинье А., Рентгенография кристаллов, Физматгиз, 1961; Бокий Г. Б., Порай-Кошиц М. А., Рентгеноструктурный анализ, Изд. МГУ, 1964; Stout G. H., Jensen L. H., X-Ray Structure Determination, McMillan Co., N. Y. — L., 1968:

Обзор по применению рентгеноструктурного анализа для исследования нуклеиновых кислот и их компонентов — см Davies D. R., Ann. Rev. Biochem, **36**, 321 (1967).

** Подробнее о спектроскопии ЯМР см.: Робертс Дж., Ядерный магнитный резонанс, Издатинлит, 1961; Робертс Дж., Введение в анализ спектров ЯМР высокого разрешения, Издатинлит, 1963; Попл Дж., Шнейдер В., Бернстейн Г., Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения, Издатинлит, 1962; Конрай Г., Усп. орг. хим., **2**, 255 (1964); Стозерс Дж. Б., в кн.: «Установление структуры органических соелинений физическими и химическими методами», кн. 1, Изд. «Химия», 1967, стр. 204, Бхакка Н., Уильямс Д., Применение ЯМР в органической химии, Изд. «Мир», 1966; Эмсли Дж., Финей Дж., Сатклиф Л., Спектроскопия ЯМР высокого разрешения, Изд. «Мир», 1968; Ионин Б. И., Ершов Б. А., ЯМР-спектроскопия в органической химии, Изд. «Химия», 1967; Bible R. H., Interpretation of NMR spektra, N. Y. Plenum press, 1965.

го расчеты двугранных углов по уравнению Карпласа могут быть только приблизительными, и для однозначного решения вопроса о конформации данного соединения иногда бывает необходимо исследование ряда модельных соединений, в которых конформация была бы фиксирована.

Некоторые данные о конформации исследуемого соединения можно получить, сравнивая химические сдвиги тех или иных атомов в модельных соединениях. Величина химического сдвига зависит, между прочим, и от наведенного магнитного поля, создаваемого соседними функциональными группами с магнитной анизотропией. Хотя точную величину этого влияния оценить трудно, определение знака эффекта не представляет обычно затруднений.

В методе дисперсии оптического вращения для стереохимических исследований имеет значение в первую очередь знак и амплитуда эффекта Коттона — характерного экстремума на кривой дисперсии оптического вращения в районе полосы УФ-поглощения данного соединения. Эти величины зависят от асимметрии электрического и магнитного поля, в котором находятся хромофор, т. е. определяются структурой и конформацией молекулы. Для целей конформационного анализа сложных органических соединений имеет значение пока лишь эмпирический подход: сравнение кривых дисперсии оптического вращения исследуемого соединения и дисперсионных кривых соединений с фиксированной конформацией. Аналогичную, по существу, информацию можно получить и из спектров кругового дихроизма исследуемого соединения *.

Необходимо подчеркнуть, что для применения трех перечисленных основных методов при изучении конформации нуклеозидов необходимы существенно различные состояния исследуемого вещества. Рентгеноструктурное исследование позволяет получить данные о конформации молекулы в кристалле, где существуют сильные межмолекулярные взаимодействия. При измерении сигналов ЯМР необходимо использовать довольно концентрированные (0,2—0,5 *M*) растворы вещества, в которых межмолекулярные взаимодействия могут быть еще значительными. Наконец, кривые дисперсии оптического вращения в области полосы поглощения можно получить лишь в разбавленных ($10^{-3}-10^{-4}$ *M*) растворах. В последнем случае межмолекулярные взаимодействия

---

* Подробнее о методах дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма см. Джерасси К., Дисперсия оптического вращения, Издатинлит, 1962; Клайн В., Усп. орг. хим., 1, 261 (1963); Веллюз Л., Легран М., Грожан М., Оптический круговой дихроизм, Изд. «Мир», 1967; Crabbé P., Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, Holden-Day, San-Francisco, 1965; Djerassi C., Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, Heyden and Sons, L., 1967.

можно считать практически исключенными и конформация исследуемого соединения может заметно отличаться от конформации в кристалле или в концентрированных растворах

Рассмотрение структурных формул нуклеозидов показывает, что свободное вращение вокруг ординарных связей в этих соединениях в значительной степени ограничено за счет существования в молекуле двух циклических структур — гетероциклического ядра и остатка пентофуранозы. Соответственно этому конформационный анализ нуклеозидов должен включать рассмотрение конформации гетероциклического ядра, углеводного остатка и взаимного расположения в пространстве этих двух циклических систем.

II. КОНФОРМАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Конформация гетероциклических ядер

Гетероциклические основания, входящие в состав обычных компонентов нуклеиновых кислот, являются квазиароматическими соединениями (см. гл. 3), для которых условием эффективного взаимодействия π-электронов в кольце является копланарность входящих в него атомов. Соответственно этому остатки гетероциклических оснований нуклеиновых кислот можно в первом приближении считать плоскими, что и используется обычно в современных пространственных моделях структуры нуклеиновых кислот и нуклеотидов.

Однако точные рентгеноструктурные исследования показали существование небольшой, но выходящей за пределы ошибки опыта искривленности пуринового и пиримидинового ядер, а также заметного отклонения от плоскости гетероциклического ядра экзоциклических заместителей в некоторых из исследованных соединений. Данные об отклонении атомов гетероциклического ядра от средней плоскости, а также о величинах межатомных расстояний и валентных углов сведены в табл. 2.1. Можно видеть, что катион цитозиния (гетероциклическое ядро в составе цитидин-3′-фосфата) существует в кристалле в виде чрезвычайно плоской ванны со слегка отклоненными в одну и ту же сторону атомами С-4 и N-1; в производных урацила и тимина такие отклонения не выходят за пределы ошибок опыта. Экзоциклические заместители С-1′, О при С-2 и С-4 или N при С-4, а также метильная группа при С-5 обычно довольно заметно выведены из плоскости гетероциклического кольца; связи их с соответствующими углеродными атомами образуют угол в 1,5—8° с плоскостью кольца. Обращает на себя внимание также заметное отклонение формы пиримидинового кольца от правильного шестиугольника и близость длины

связей C—N в кольце и связи C—N с экзоциклической аминогруппой.

В случае производных пуринов можно отметить отклонение от плоскости кольца атомов C-5 и N-1 в катионе адениния, входящем в состав аденозин-5′- и 3′-фосфатов, и атома N-9 аденина в остатке 2′-дезоксиаденозина.

Значение обнаруженных небольших искривлений гетероциклических ядер нуклеозидов и нуклеотидов в кристаллах остается пока неясным, однако эти данные должны, вероятно, учитываться при построении более точных моделей нуклеиновых кислот *.

Гетероциклические основания большинства редких компонентов нуклеиновых кислот, по-видимому, довольно близки по своей пространственной структуре к гетероциклическим основаниям соответствующих обычных компонентов; рентгеноструктурные данные для оснований редких компонентов отсутствуют.

Исключением из аналогии является, очевидно, лишь 5,6-дигидроуридин, в котором гетероциклическое основание должно иметь конформацию, заметно отличающуюся от плоской. На основании изучения спектров ЯМР для дигидроурацила I и его метильных производных (II, III) был сделан вывод о существовании этих соединений в конформации полукресла[8]:

I (R = R′ = H)

II (R = CH_3, R′ = H)

III (R = H, R′ = CH_3)

Этот вывод подтвержден рентгеноструктурным анализом дигидротимина[9] и изучением кинетики кислотного и щелочного гидролиза ряда производных дигидроурацила[10]. Аналогичная конформация гетероциклического ядра преобладает и в дигидроурациле, что показано также и рентгеноструктурным анализом[67].

---

* В работе[68] приведены усредненные значения для длин связей и валентных углов гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, полученные из последних рентгеноструктурных данных.

Таблица 2.1. **Структура гетероциклических оснований компонентов нуклеиновых кислот по данным рентгеноструктурного анализа**

Соединение	Отклонение атомов от средней плоскости кольца Å	Межатомные расстояния Å	Валентные углы в градусах
Катион цитозиния в цитидин-3'-фосфате [1]			
Катион цитозиния в цитидин-3'-фосфате [2]			
Тимин в тимидин-5'-фосфате [3]			
Урацил в уридин-5'-фосфате [4]			

Продолжение табл. 2.1

Соединение	Отклонение атомов от средней плоскости кольца Å	Межатомные расстояния Å	Валентные углы в градусах
Аденин* в 2'-дезоксиаденозине [5]			
Катион аденина* в аденозин-5'-фосфате [6]			
Катион аденина* в аденозин-3'-фосфате [7]			

* Указаны только наиболее значительные величины отклонений атомов от плоскости.

2. Конформация углеводных остатков

Как известно, для производных циклопентана наиболее устойчивыми являются не плоские конформации, а такие, в которых один атом углерода несколько выведен из плоскости (C_s-конформация) или два соседних атома углерода выведены из плоскости

Таблица 2.1. **Структура гетероциклических оснований компонентов нуклеиновых кислот по данным рентгеноструктурного анализа**

Соединение	Отклонение атомов от средней плоскости кольца Å	Межатомные расстояния Å	Валентные углы в градусах
Катион цитозиния в цитидин-3′-фосфате [1]	(−0,004) C-1′ (0,036) O N (0,022) 1 H(−0,065) (−0,012) 2 6 (−0,009) (−0,001) N 3 5 (−0,014) H 4 (0,024) H (0,098) N (0,104) H H	C-1′ 1,47 O 1,10 N 1,35 H 1,20 0,92 1,38 1,35 N 1,11 H 1,34 1,42 0,97 H 1,32 N H 0,91 H	C-1′ 118 120 O 124 N 121 H 122 122 114 123 116 123 N 126 118 116 H 111 118 126 H 120 122 109 N 114 H 136 H
Катион цитозиния в цитидин-3′-фосфате [2]	(0,120) C-1′ (−0,007) O N (0,005) H(−0,06) 1 (0,006) 2 6 (0,004) (−0,005) N 3 5 (−0,017) H 4 (−0,014) H (0,02) (−0,24) N (0,037) (0,05) H H (0,09)	C-1′ 1,48 O 1,21 1,38 N 1,36 H 1,40 1,33 N H 1,35 1,40 H 1,31 N H H	C-1′ 118 120 O 124 N H 122 122 114 123 118 124 N H 118 H 121 121 N H H
Тимин в тимидин-5′-фосфате [3]	(−0,050) C-1′ (0,101) O N (−0,012) H 1 (−0,004) 2 6 (0,009) (−0,003) N 3 5 (0,008) H 4 (0,007) C (0,061) O (−0,064)	C-1′ 1,47 O 1,22 1,38 N 1,35 H 1,38 1,38 N H 1,38 1,41 1,54 C 1,22 O	C-1′ 118 121 O 121 N H 123 116 121 120 N 124 120 120 H 116 120 C 122 122 O
Урацил в уридин-5′-фосфате [4]	(0,12) C-1′ (−0,14) O N (0,02) H 1 (−0,04) 2 6 (−0,01) (0,05) N 3 5 (0,02), H 4 (−0,04) H O (−0,04)	C-1′ 1,44 O 1,22 1,39 N 1,38 H 1,41 1,30 N H 1,40 1,41 H 1,29 O	C-1′ 116 120 O 124 N H 124 112 124 122 N H 120 116 H 118 125 H O

Продолжение табл. 2.1

Соединение	Отклонение атомов от средней плоскости кольца Å	Межатомные расстояния Å	Валентные углы в градусах
Аденин* в 2'-дезоксиаденозине [5]	C-1' (0,22); N9 (0,019); N (аминогруппа) (0,016)	C-1'–N9 1,47; 1,33; 1,34; 1,37; 1,36; 1,32; 1,39; 1,31; 1,34; 1,41; 1,37; 1,33	123; 130; 129; 111; 125; 127; 105; 107; 113; 120; 118; 115; 111; 104; 119; 123; 131
Катион аденининия* в аденозин-5'-фосфате [6]	C-1' (0,211); C5 (−0,043); N1 (0,051)	C-1'–N9 1,49; 1,31; 1,31; 1,38; 1,40; 1,37; 1,40; 1,33; 1,36; 1,35; 1,36; 1,31	129; 131; 127; 126; 112; 123; 104; 107; 112; 123; 116; 112; 117; 121; 124; 132
Катион аденининия* в аденозин-3'-фосфате [7]	C-1' (0,084); N (аминогруппа) (0,033)	C-1'–N9 1,48; 1,31; 1,35; 1,35; 1,37; 1,35; 1,38; 1,31; 1,36; 1,40; 1,38; 1,32	125; 134; 127; 126; 112; 121; 106; 107; 113; 123; 114; 117; 112; 103; 120; 120; 131

* Указаны только наиболее значительные величины отклонений атомов от плоскости.

2. Конформация углеводных остатков

Как известно, для производных циклопентана наиболее устойчивыми являются не плоские конформации, а такие, в которых один атом углерода несколько выведен из плоскости (C_s-конформация) или два соседних атома углерода выведены из плоскости

в противоположные стороны (C_2-конформация)[11].

плоская C_s C_2

Заместители у атомов углерода, расположенных в плоскости цикла, занимают симметричные, так называемые биссектриальные положения *b*. Для атомов, выведенных из плоскости, эти положения

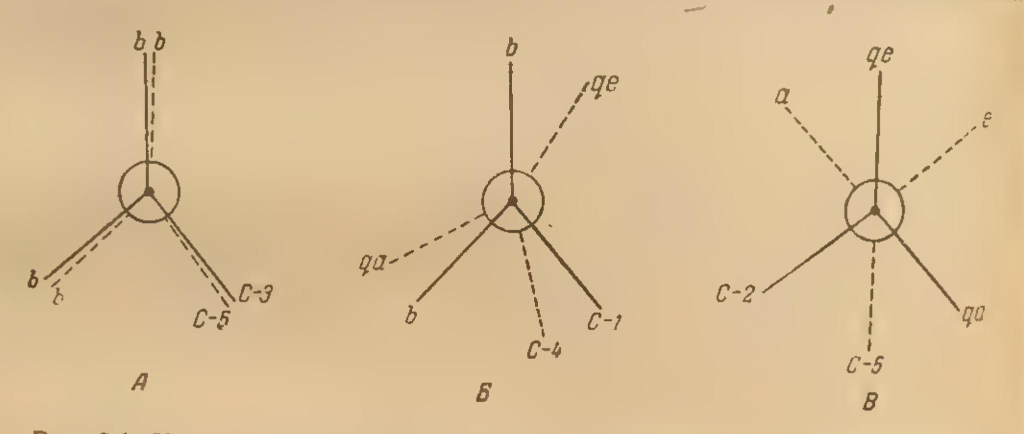


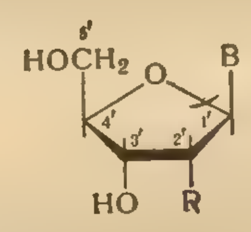
Рис. 2.1. Ньюменовские проекции в C_s-конформации циклопентана вдоль связей:
С-1—С-2 (*А*); С-2—С-3 (*Б*); С-3—С-4 (*В*); нумерацию атомов в цикле см. выше.

неравноценны. Связь углерода с заместителем, занимающим экваториальное положение *e*, приблизительно параллельна плоскости кольца, связь же с аксиальным заместителем *a* приблизительно перпендикулярна ей. Наконец, расположение заместителей у атомов углерода, соседних с выведенным из плоскости, носит промежуточный характер: можно говорить о квазиэкваториальном *qe*- и квазиаксиальном *qa*-положении заместителей. Как видно из рис. 2.1, взаимодействие ковалентно-несвязанных заместителей у соседних углеродных атомов сильно изменяется при выведении соответствующего углеродного атома из плоскости цикла.

Пятичленный цикл остатка пентофуранозы может принимать конформации, аналогичные конформациям циклопентана. Вследствие асимметрии тетрагидрофуранового цикла каждой конфор-

мации циклопентана соответствуют пять различных теоретически возможных конформаций тетрагидрофурана и десять различных конформаций пентофураноз. Конформации, аналогичные C_s-конформации циклопентана, принято называть конформациями конверта (envelope) и сокращенно обозначать[12] как V^n, где n — номер углеродного атома пентозы, выведенного из плоскости; индекс ставится сверху, если атом выведен из плоскости в ту же сторону, в которую обращена оксиметильная группа остатка сахара, и снизу, если углеродный атом выведен в противоположную сторону. Другое принятое обозначение для V^n- и V_n-конформаций — C_n-*эндо*- и C_n-*экзо*-конформации соответственно. Конформации, соответствующие C_2-конформации циклопентана, называются изогнутыми (twist) или твист-конформациями и сокращенно обозначаются T^n_{n+1} и T^{n+1}_n или C_n-*эндо*- и C_{n+1}-*экзо*-.

Можно ожидать, что, поскольку при атоме кислорода пентофуранозного цикла не имеется заместителей, более выгодным с энергетической точки зрения будет выведение из плоскости цикла не этого атома или соседних с ним атомов С-1′ или С-4′, а атомов С-2′ или С-3′.



B–остаток основания; R=H или OH

Соответствующие конформации остатков рибозы или дезоксирибозы в нуклеозидах представлены в табл. 2.2; здесь же приведены положения, занимаемые заместителями цикла (CH_2OH при С-4′, остаток основания при С-1′, гидроксильная группа при С-3′, а в случае рибозы — гидроксильная группа и при С-2′) в этих конформациях. Можно видеть, что во всех случаях по крайней мере один из объемистых заместителей занимает невыгодное биссектриальное или квазиаксиальное положение и различные конформации, по-видимому довольно близки по своей устойчивости.

В табл. 2.2 показана также единственно возможная конформация остатка рибозы или дезоксирибозы в нуклеозидах, при которой наиболее объемистые заместители занимают квазиэкваториальные положения — конформации V^O (О-*эндо*-)X, когда из плоскости выведен кислород цикла. При этой конформации, однако, гидроксильные группы при С-2′ и С-3′ остатка рибозы занимают крайне невыгодные (см. рис. 2.1) биссектриальные положения.

Таблица 2.2 **Конформации нуклеозидов и положение заместителей остатка рибофуранозы в них**

Конформация	Формула	Положение заместителей			
		CH_2OH	гетероциклическое основание B	OH (при C-3′)	R (при C-2′)
$V^{3'}$	IV	*qe*	*b*	*e*	*qa*
$V^{2'}$	V	*b*	*qe*	*qa*	*e*
$V_{3'}$	VII	*qa*	*b*	*a*	*qe*
$V_{2'}$	VIII	*b*	*qa*	*qe*	*a*
$T^{3'}_{2'}$	VI	*qe*	*qa*	*e*	*a*
$T^{2'}_{3'}$	IX	*qa*	*qe*	*a*	*e*
V^{0}	X	*qe*	*qe*	*b*	*b*

$V^{3'}$ (IV) $V^{2'}$ (V) $T^{3'}_{2'}$ (VI)

$V_{3'}$ (VII) $V_{2'}$ (VIII) $T^{2'}_{3'}$ (IX)

V^{0} (X)

B—остаток основания; R=H или OH

Экспериментальные данные, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа, показывают, что остаток рибозы в нуклеозидах и нуклеотидах имеет обычно конформацию $V^{3'}$. Такая конформация углеводного остатка была, например, показана рентгеноструктурным исследованием кристаллов цитидина[13, 14], уридина[14], уридин-5′-фосфата[4], аденозина[14] и комплекса аденозин · 5-бромуридин[15]. Более точные рентгеноструктурные исследования (табл. 2.3) показывают, что наряду со значительным отклонением (0,5—0,6 Å) 3′-углеродного атома остатка рибозы от плоскости кольца, соседний (С-2′) углеродный атом также выведен из этой плоскости на 0,10—0,15 Å в ту же самую или противоположную сторону. Остаток рибозы, таким образом, имеет при этом конформацию, промежуточную между идеализированными конформациями, рассмотренными выше. Так, конформация остатка рибозы в аденозин-3′-фосфате[7] является промежуточной между конформациями $V^{3'}$ и $V^{2'}$ (ближе к первой), а в аденозин-5′-фосфате[6] — между конформациями $V^{3'}$ и $T_{2'}^{3'}$.

Таблица 2.3 **Отклонения атомов в остатке рибозы рибонуклеотидов от плоскости С-1′—С-4′—О**

Соединение	Отклонение, Å				Литература
	С-2′	С-3′	С-5′	N (гетероциклического кольца)	
Цитидин-3′-фосфат . . .	0,434	−0,146	1,236	0,889	*1*
Аденозин-5′-фосфат . .	−0,120	0,573	0,722	1,273	*6*
Аденозин-3′-фосфат . .	0,075	0,620	—	—	*7*
Уридин-5′-фосфат . . .	0,52	−0,02	1,16	0,92	*4*

В ряде случаев, однако, доказано существование и других конформаций рибозного остатка. Так, в случае цитидин-3′-фосфата[1] остаток сахара имеет конформацию, промежуточную между $V^{2'}$ и $T_{3'}^{2'}$ (ближе к первой), а для 5-бромуридина[16] — конформацию $V_{2'}$.

Необычная конформация остатка рибозы, в которой из плоскости кольца выступает углеродный атом С-4′, была обнаружена в кристаллах аденозин-3′, 5′-циклофосфата XI[17]; такое изменение конформации вызвано образованием конденсированной системы, содержащей шести- и пятичленный циклы. В другом исследованном нуклеозиде аналогичной структуры — уридин-3′,5′-циклофосфате

XII[18] остаток сахара имеет $V^{3'}$-конформацию.

(XI) (XII)

XI XII

Были сделаны попытки применить для определения конформации углеводного остатка нуклеозидов и нуклеотидов в растворах метод ЯМР, однако полученные результаты не поддаются однозначной трактовке и проблема остается нерешенной.

Обычно исследование конформации остатка рибозы в нуклеозидах и нуклеотидах с помощью спектроскопии ЯМР основано на анализе изменения константы взаимодействия протона при С-1′ в различных нуклеозидах ($J_{1',2'}$), поскольку сигнал этого протона заметно отличается по величине химического сдвига от сигналов других протонов нуклеозидов и его расщепление легко наблюдать. Как показывает рассмотрение молекулярных моделей, конформации $V^{3'}$ отвечает двугранный угол $\Phi_{1',2'} = 115°$, а конформации $V^{2'}$ — угол $\Phi_{1',2'} = 150°$, что отвечает значениям констант расщепления $J_{1',2'}$ 1,7 и 6,9 *гц* соответственно*. По экспериментальным данным (табл. 2.4), значения $J_{1',2'}$ в нуклеозидах и нуклеотидах находятся в пределах 3—6,5 *гц* и увеличиваются в ряду

цитидин < уридин < аденозин < гуанозин

В ранней работе[23] по спектрам ЯМР нуклеозидов и нуклеотидов был сделан вывод о преобладании конформации $V^{2'}$ в пуриновых нуклеозидах и $V^{3'}$ в пиримидиновых нуклеозидах, однако

* Эти значения получены при помощи первоначальных параметров уравнения Карпласа (см. стр. 122). В последнее время предложен ряд других эмпирических уравнений, связывающих величину константы спин-спинового взаимодействия с двугранным углом.

этот вывод не является достаточно строгим, так как изменение $J_{1',2'}$ может быть обусловлено и другими факторами, например изменением электроотрицательности заместителя у С-1′ (ср. гл. 3). Показано далее, что длины связей и валентные углы в производных рибофуранозы заметно отличаются от стандартных значений[24], и использовать обычные молекулярные модели для точного определения угла $\Phi_{1',2'}$, очевидно, невозможно. Наблюдаемые значения для нуклеозидов можно, по-видимому, считать достаточно хорошо согласующимися как с конформацией $V^{3'}$ (которая преобладает в кристаллах по данным рентгеноструктурных исследований), так и с конформацией $V^{2'}$.

Таблица 2.4 **Экспериментально определенные значения константы спин-спинового взаимодействия $J_{1',2'}$ для нуклеозидов и нуклеотидов**

Соединение	$J_{1',2'}$ в D_2O, *гц*		
	по данным[20]	по данным[21]	по данным[22]
Гуанозин	6,4	6,4	—
Аденозин	5,0	5,5	5,7
Аденозин-5′-фосфат	4,5	—	—
Аденозин-3′-фосфат	4,2	—	5,2
	(по данным [19])		
Уридин	—	3,3	4,0
Уридин-3′-фосфат	—	—	4,2
Цитидин	3,0	3,0	—

Рентгеноструктурный анализ нуклеозидов и нуклеотидов (рибо- и дезоксирибо-ряда) показывает близкую аналогию конформации остатков 2′-дезоксирибозы и рибозы в них. Наиболее точные, по нашему мнению, данные об отклонении атомов в остатках моносахарида дезоксирибонуклеозидов и дезоксирибонуклеотидов от плоскости С-1′—С-4′—О сведены в табл. 2.5.

Эти данные показывают, что конформацию 2′-дезоксиаденозина следует считать промежуточной между $V_{3'}$- и $T_{3'}^{2'}$-конформациями; конформацию тимидин-5′-фосфата — близкой к конформации аденозин-3′-фосфата (промежуточная между $V^{3'}$- и $V^{2'}$-конформациями), а 5-фтор-2′-дезоксиуридина — к конформации цитидин-3′-фосфата (промежуточная между $V^{2'}$- и $T_{3'}^{2'}$-конформациями). В других исследованиях остатку 2′-дезоксирибозы приписана $V^{2'}$-конформация; она обнаружена в 5-бром-2′-дезоксиуридине[26], 5-иод-2′-дезоксиуридине[27] и нуклеозидах, входящих в комплекс 2′-дезоксигуанозина с 5-бром-2′-дезоксицитидином[28].

Исследование конформации 2′- дезоксинуклеозидов в растворе с помощью ЯМР-спектроскопии привело к выводу о V^{0}-конформации

остатка 2′-дезоксирибозы[29]. Этот вывод основан на предположении о количественном выполнении уравнения Карпласа и измерении двугранных углов $Ф_{1',2'}$ и $Ф_{2',3'}$ в атомных моделях различных конформаций 2′-дезоксирибозы; однако такой подход кажется в настоящее время неправомочным и нуждается в пересмотре.

Таким образом, в целом полученные данные показывают, что в разных природных нуклеозидах и нуклеотидах реализуются различные конформации остатка сахара; это указывает на значительную близость значений энергии разных конформаций.

3. Взаимное расположение углеводных остатков и гетероциклических ядер

Для однозначного определения взаимного расположения остатка сахара и гетероциклического основания в нуклеозидах необходимо помимо знания длины C—N-гликозидной связи и угла, образуемого ею с плоскостью гетероциклического основания (см. табл. 2.1), определить еще две угловые величины.

Одна из них — двугранный угол, образуемый плоскостями основания и пентофуранозного остатка; этот угол может быть определен лишь из данных рентгеноструктурного анализа. Найденные значения двугранного угла находятся в пределах 65—80°; при определении его за плоскость пентофуранозы принимают обычно не плоскость C-1′—C-4′—O, а «среднюю» плоскость (плоскость, сумма квадратов отклонений от которой всех атомов пентофуранозного цикла минимальна), так что найденные различия могут частично отражать различия в конформации углеводного остатка. Большинство определенных экспериментально значений попадает, однако, в интервал 70—75°.

Другая дополнительная угловая величина характеризует взаимный поворот остатка сахара и гетероциклического основания вокруг гликозидной связи C-1—N. Этот поворот принято характеризовать углом вращения $Ф_{C,N}$, образуемым проекциями связей C-1′—O и N-1—C-6 в пиримидиновых (или C-1′—O и N-9—C-8 в пуриновых) остатках на плоскость, перпендикулярную связи C-1′—O, как это показано на приведенных ниже ньюменовских проекциях:

C-6; O; $Ф_{CN}$; H (при C-1′); C-2; C-2′

для пиримидиновых нуклеозидов

C-8; O; $Ф_{CN}$; H (при C-1′); C-4; C-2′

для пуриновых нуклеозидов

Угол $\Phi_{C, N}$ принято считать положительным при отсчете по часовой стрелке.

Рассмотрение молекулярных моделей показывает, что свободное вращение вокруг N-гликозидной связи в нуклеозидах затруднено. Особенно сильные ограничения наблюдаются в пиримидиновых нуклеозидах вследствие взаимодействия кислородного атома при C-2 или атома водорода при C-6 гетероциклического ядра с заместителями при C-2′ и C-3′ остатка сахара, а также с кислородом фуранозного цикла. Меньшие взаимодействия, по-видимому, существуют в пуриновых нуклеозидах, однако и в этом случае атом N-3 пуринового кольца может при повороте остатка рибозы вокруг N-гликозидной связи приходить в близкое соприкосновение с циклическим кислородом остатка сахара и атомом водорода при C-2′ или C-3′. Наименьшие взаимодействия наблюдаются при значениях $\Phi_{C, N}$, равных —30° и +150°; конформации, отвечающие этим значениям угла вращения, принято называть *анти-* и *син-*конформациями нуклеозидов[30]. Например, в случае уридина и аденозина:

Данный качественный вывод, полученный на основании рассмотрения молекулярных моделей, был подтвержден более точным анализом изменения межатомных расстояний при вращении остатка рибозы вокруг N-гликозидной связи [31] в нуклеозидах и нуклеотидах, а также квантовохимическим расчетом изменений энергии системы при изменении угла $\Phi_{C, N}$ [32].

Таблица 2.5. **Отклонения атомов в остатках моносахарида дезоксирибонуклеозидов и дезоксинуклеотидов от плоскости C-1′—C-4′—O**

Соединение	Отклонение, Å				Литература
	C-2′	C-3′	C-5′	N (гетероциклического кольца)	
2′-Дезоксиаденозин	0,60	−0,504	1,358	1,187	*5*
Тимидин-5′-фосфат	0,098	0,602	0,698	1,103	*13*
5-Фтор-2′-дезоксиуридин	0,494	−0,170	1,281	1,183	*25*

Результаты рентгеноструктурного исследования ряда рибонуклеозидов и рибонуклеотидов показывают, что, как правило, во всех изученных случаях конформация этих соединений в кристалле довольно близка к *анти*-конформации (табл. 2.6), хотя для производных пиримидинов абсолютная величина угла $\Phi_{C, N}$ обычно несколько больше, чем для производных пуринов.

Таблица 2.6. **Значения угла вращения $\Phi_{C, N}$ для ряда рибонуклеозидов и рибонуклеотидов**

Соединение	$\Phi_{C, N}$, градусы	Литература
Пиримидиновые производные		
Уридин-5′-фосфат	−43	*4*
Цитидин-3′-фосфат	−42	*1*
Цитидин	−18	*13*
5-Бромуридин (в комплексе с аденозином)	−20	*15*
Пуриновые производные		
Аденозин-5′-фосфат	−18	*6*
Аденозин-3′-фосфат	−4	*7*
Аденозин (в комплексе с 5-бромуридином)	−10	*15*

Таблица 2.7 **Значение амплитуды эффекта Коттона a для нуклеозидов, нуклеотидов и некоторых модельных ангидросоединений пиримидинового ряда** [33]

Соединение	Формула	$a \cdot 10^{-2}$, градусы	$\Phi_{C,N'}$ (приблизительное значение), градусы
Уридин	—	+117	—
Цитидин	—	+152	—
Цитидин-3′-фосфат	—	+204	—
Цитидин-5′-фосфат	—	+137	—
5′,6-*экзо*-O-Цикло-6-оксиуридин . . .	XIII	+490	− 30
2′,2-*экзо*-O-Циклоуридин	XIV	+266	− 60
3′,2-*экзо*-O-Циклоуридин	XV	+43	+105
2′,3′-O-Изопропилиден-5′,2-*экзо*-O-циклоуридин	XVI	−539 *	+150
2-O-Этил-2′,3′-O-изопропилиденуридин	XVII	+227	—

* Значение занижено по абсолютной величине.

XIII

XIV

XV

XVI

XVII

Исключением являются кристаллы аденозин-3′,5′-циклофосфата[17]: в элементарную ячейку кристалла входят две молекулы соединения, одна из которых находится в *анти*-конформации ($\Phi_{C,N}$ —50°), а другая — в *син*-конформации ($\Phi_{C,N}$ +102°). Недавно показано[69], что 4-тиоуридин имеет в кристаллах *син*-конформацию ($\Phi_{C,N}$ +83°).

Для пиримидиновых нуклеозидов *анти*-конформация является предпочтительной конформацией и в растворах, как показало изучение дисперсии оптического вращения. Эти соединения имеют положительный эффект Коттона с довольно большой амплитудой[33–36] (табл. 2.7). Изучение кривых дисперсии оптического вращения модельных ангидросоединений (XIII—XVI)[33] с фиксированным положением остатка рибозы и гетероциклического основания показывает, что амплитуда эффекта Коттона сильно зависит от их взаимной ориентации.

Увеличение угла вращения $\Phi_{C,N}$ приводит к уменьшению амплитуды положительного эффекта Коттона; для соединения XVI с фиксированной *син*-конформацией наблюдается большой отрицательный эффект Коттона, причем изменение знака эффекта Коттона не связано с изменением хромофора при переходе от уридина к 2-О-замещенным производным уридина, как это видно из значения амплитуды для 2-О-этил-2′,3′-О-изопропилиденуридина XVII. Эти данные ясно показывают, что для пиримидиновых нуклеозидов в растворе предпочтительной является *анти*-конформация, хотя вращение вокруг С-1′—N-гликозидной связи все же возможно; это и приводит к уменьшению амплитуды эффекта Коттона по сравнению с соединениями с фиксированной конформацией. *анти*-Конформация пиримидиновых нуклеозидов в растворах подтверждается и данными ЯМР. Это было показано для растворов ацетатов нуклеозидов в диметилсульфоксиде, где изменение химического сдвига протонов ацетильной группы при С-2′ при переходе от производных уридина к производным 5,6-дигидроуридина указывает на заметное влияние магнитной анизотропии двойной связи и, следовательно, на сближенность в пространстве метильных протонов ацетильной группы при С-2′ и двойной связи[37]. Изучение зависимости химического сдвига протона при С-6 пиримидинового кольца в нуклеозид-5′-фосфатах от pH указывает на пространственную близость фосфатной группы к этому протону, что возможно лишь при *анти*-конформации[38, 71].

Вопрос о предпочтительной конформации пуриновых нуклеозидов в растворах не выяснен до конца. Для этих соединений в растворах характерен отрицательный эффект Коттона[34, 35]. Аналогичный знак эффекта Коттона наблюдается и в случае 2′,3′-О-изопропилиден-3,5′-циклонуклеозидов пуринового ряда[36, 39], например в производном аденозина XVIII.

С другой стороны, модельные соединения, в которых остаток рибозы фиксирован в *анти*-конформации, например 8,2′-ангидро-8-окси-9-β-*D*-арабинофуранозиладенин XIX, имеют положительный эффект Коттона [40, 41], что позволяет сделать вывод о *син*-конформации пуриновых нуклеозидов в растворе. Это заключение подтверждается [42] изменением знака эффекта Коттона производных аденозина при введении по С-5′ объемистых заместителей, которые делают невозможным существование соединения в *син*-конформации *.

XVIII XIX

Данные спектров ЯМР нуклеозид-5′-фосфатов указывают, однако, на заметное влияние ионизации фосфатной группы на химический сдвиг протона при С-8, но не при С-2, что возможно лишь при *анти*-конформации [38]. Наконец, как недавно было обнаружено, при изменении pH происходит изменение знака эффекта Коттона для производных гуанозина [43]; это можно трактовать как возможность обратимых переходов между *син*- и *анти*-конформациями нуклеозида **.

Преимущественная конформация дезоксирибонуклеозидов и дезоксирибонуклеотидов, по-видимому, аналогична конформации соответствующих производных рибозы. Имеющиеся данные рентгеноструктурных исследований (табл. 2.8) показывают, что в большинстве случаев конформация дезоксинуклеозидов и дезоксирибонуклеотидов в кристалле близка к *анти*-конформации, хотя в одном случае получено доказательство *син*-конформации.

---

* С гипотезой об *анти*-конформации производных аденозина согласуются результаты приближенных расчетов вращательной силы этих соединений [70].

** Исследование спектров ЯМР 2′,3′-О-изопропилиденаденозина, 2′,3′-О-изопропилиденгуанозина и 3,5′-цикло-2′,3′-О-изопропилиденаденозина методом двойного резонанса позволяет сделать вывод о возможности обратимых переходов между *син*- и *анти*-конформациями, причем для производных аденозина *анти*-конформация менее выгодна, чем для производных гуанозина [72].

Кривые дисперсии оптического вращения пиримидиндезоксирибозидов имеют положительный эффект Коттона[34, 44]; для модельного соединения с фиксированной *син*-конформацией 5′,2-*экзо*-О-циклотимидина отмечен отрицательный эффект Коттона, что позволяет предполагать преобладание *анти*-конформеров в растворах

Таблица 2.8 **Значения угла вращения $\Phi_{C,N}$ для ряда дезоксирибонуклеозидов и дезоксирибонуклеотидов**

Соединение	$\Phi_{C,N}$, градусы	Литература
Пиримидиновые производные		
Тимидин-5′-фосфат	−48	*3*
2′-Дезокси-5-бромцитидин (в комплексе с 2′-дезоксигуанозином)	−61	*28*
2′-Дезокси-5-фторуридин	−62	*26*
2′-Дезокси-5-бромуридин	−43	*26*
2′-Дезокси-5-иодуридин	−65	*27*
Пуриновые производные		
2′-Дезоксиаденозин	−3	*5*
2′-Дезоксигуанозин (в комплексе с 2′-дезокси-5-бромцитидином)	+138	*28*

соединений, у которых возможно вращение вокруг гликозидной связи. Пуриндезоксирибозиды аналогичны пуринрибозидам, как можно судить по характеру кривых дисперсии оптического вращения (отрицательный эффект Коттона) и изменению спектра ЯМР при изменении pH; отсюда можно сделать вывод, что конформации этих соединений, по-видимому, близки.

4. Внутримолекулярные взаимодействия

В приведенном выше обсуждении теоретически возможных конформаций нуклеозидов (см. стр. 129) мы принимали во внимание в качестве главных факторов, определяющих конформацию, лишь ван-дер-ваальсовы силы отталкивания. Между тем в молекулах нуклеозидов и нуклеотидов имеется достаточное количество функциональных групп, между которыми могут возникать взаимодействия. Такие внутримолекулярные взаимодействия могут оказывать существенное влияние на конформацию нуклеозидов и нуклеотидов в разбавленных растворах. Хотя детальное рассмотрение этого вопроса в настоящее время невозможно, краткое обсуждение имеющихся данных о внутримолекулярных взаимодействиях в нуклеозидах и нуклеотидах кажется целесообразным.

Существует довольно обширная литература, касающаяся возможности возникновения внутримолекулярных водородных свя-

зей между гидроксильной группой при С-2′ остатка рибозы и карбонильной группой при С-2 пиримидинового основания:

Возможность образования такой водородной связи может быть легко продемонстрирована на молекулярных моделях нуклеозидов с *анти*-конформацией. Впервые предположение о таком взаимодействии было выдвинуто для объяснения различия УФ-спектров в сильнощелочной среде уридина и уридин-3′-фосфата, с одной стороны, и уридин-2′-фосфата, с другой стороны [45]. Прямых доказательств образования такого рода водородной связи до сих пор не получено. Расстояние между атомами кислорода 2-*экзо*-О и 2′-*экзо*-О в кристаллах пиримидиновых рибонуклеозидов и рибонуклеотидов, полученное на основании данных рентгенографии, превышает расстояние, требуемое для образования водородной связи. Однако это не удивительно, так как в кристаллической решетке и тот и другой атомы кислорода находятся в непосредственной близости с функциональными группами соседних молекул нуклеотида; такие межмолекулярные взаимодействия могут преобладать в данном случае над внутримолекулярными взаимодействиями, существующими в разбавленных растворах.

Имеющиеся косвенные доказательства существования водородной связи между карбонильной группой при С-2 пиримидинового кольца и водородом гидроксильной группы при С-2′ остатка рибозы можно разбить на две группы. Одна группа — это данные о различии физических свойств или химической реакционной способности для пиримидиновых нуклеозидов и их производных, в которых имеется гидроксильная группа при С-2′ (например, уридин, уридин-3′-фосфат, уридин-5′-фосфат) и производных, в которых эта гидроксильная группа отсутствует (например, 2′-дезоксиуридин, уридин-2′-фосфат, алкилурацилы). Помимо уже упоминавшихся данных по УФ-спектрам производных уридина сюда относятся данные о различии констант ионизации для производных цитозина этих двух групп [46], отличия в спектрах ЯМР пиримидиновых нуклеотидов [38], а также различие в скоростях протекания некоторых реакций рибо- и дезоксирибонуклеозидов (например, фотохимической гидратации производных цитидина [47], каталитического гидрирования [48] и гидроксиламинолиза [49] производных уридина).

Другая группа косвенных доказательств — это данные по изменению реакционной способности функциональных групп остатка сахара или фосфата в зависимости от природы гетероциклического основания. Такого рода различия отмечались часто, однако детальные кинетические исследования в этой области почти отсутствуют. Примером подобных исследований может служить работа Витцеля[50] по кинетике гидролиза динуклеозидмонофосфатов, содержащих остаток пиримидиновых нуклеозид-3′-фосфатов, по сравнению с аналогичными соединениями, содержащими остаток пуриновых нуклеозид-3′-фосфатов. Наблюдаемые кинетические отличия можно объяснить повышенной нуклеофильностью гидроксильной группы при С-2′ пиримидиннуклеозидов за счет образования водородной связи с гетероциклическим ядром. Представления о взаимодействии карбонильной группы при С-2 пиримидина с гидроксильной группой при С-2′ остатка рибозы используются для объяснения механизма действия панкреатической рибонуклеазы[51, 52].

В литературе имеются также данные, которые можно рассматривать как косвенные указания на возможность внутримолекулярного образования водородных связей и в пуриновых нуклеозидах с участием N-3 гетероциклического ядра и гидроксила при С-2′ рибозы. К их числу относятся некоторые различия в УФ-спектрах[51] и спектрах ЯМР[38, 53] пуриновых рибо- и 2′-дезоксирибонуклеозидов.

В настоящее время накоплен достаточно большой фактический материал по различию физико-химических характеристик олиго- и полинуклеотидов, содержащих рибо- и дезоксирибонуклеотиды (подробнее — см. гл. 4). Разумной причиной таких различий является, по-видимому, какое-либо участие гидроксильной группы при С-2′ остатка рибозы в стабилизации конформации полинуклеотидной цепи в случае рибополимеров. Помимо образования водородной связи с карбонильной группой пиримидинового основания (или N-3 пуринового основания), для объяснения наблюдаемых свойств предполагается образование водородных связей с кислородами фосфатной группы[54]:

···—OCH₂ O B
O O O
P H
··—O O···

B—остаток основания

Такое взаимодействие, очевидно, возможно и в мономерных нуклеозид-3′-фосфатах.

Внутримолекулярные взаимодействия, обусловленные водородными связями, могут существовать и в более сложных низкомолекулярных нуклеотидных производных, таких, как нуклеозиддифосфатсахара[55], нуклеозид-5′-фосфо(P—N)аминокислоты и -пептиды[56].

В подобных нуклеотидпроизводных, которые содержат в качестве заместителя остатки гетероциклических оснований (с ароматическими свойствами), могут возникать внутримолекулярные взаимодействия другого рода — взаимодействие двух ароматических систем, аналогичное взаимодействиям, наблюдающимся в полинуклеотидах (см. гл. 4). Такого рода внутримолекулярные взаимодействия надежно доказаны для никотинамидадениндинуклеотида[57—62], флавинадениндинуклеотида[63—66] и их производных.

Сильные взаимодействия между двумя гетероциклическими основаниями наблюдаются в P^1,P^2-динуклеозид-5′-пирофосфатах и в динуклеозидмонофосфатах. Такого рода взаимодействия играют важную роль в стабилизации определенной конформации олиго- и полинуклеотидов, они будут подробнее рассмотрены в гл. 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sundaralingam M., Jensen L. H., J. Mol. Biol., **13**, 914 (1965).
2. Bugg C. E., Marsh R. E., J. Mol. Biol., **25**, 67 (1967).
3. Trueblood K. N., Horn P., Luzzati V., Acta cryst., **14**, 965 (1961).
4. Shefter E., Trueblood K. N., Acta cryst., **18**, 1067 (1965).
5. Watson D. G., Sutor D. J., Tollin P., Acta cryst. **19**, 111 (1965).
6. Kraut J., Jensen L. H., Acta cryst., **16**, 79 (1963).
7. Sundaralingam M., Acta cryst., **21**, 495 (1966).
8. Roullier P., Delmau J., Nofre C., Bull. Soc. chim. France, **1966**, 3515.
9. Furberg S., Jensen L. H., J. Am. Chem. Soc., **90**, 470 (1968).
10. Kurtev B., Pojarliev I., Blagoeva I., Burgudjiev I., Abstr. Papers XXIst Intern. Congr. Pure. Appl. Chem., Nucl. Acid Components, № 2, Prague, 1967.
11. Kilpatrick J. E., Pitzer K. S., Spitzer R., J. Am. Chem. Soc., **69**, 2483 (1947).
12. Hall L. D., Chem. a. Ind., **1963**, 950.
13. Furberg S., Peterson C. S., Romming C., Acta cryst., **18**, 313 (1965).
14. Furberg S., Acta Chem. Scand., **4**, 751 (1950).
15. Haschemeyer A. E., Sobell H. M., Acta cryst., **18**, 525 (1965).
16. Iball J., Morgan C. H., Wilson H. R., Proc. Roy. Soc., **A295**, 320 (1966).
17. Watenpaugh K., Dow J., Jensen L. H., Furberg S., Science, **159**, 206 (1968).
18. Coulter C. L., Science, **159**, 888 (1968).
19. Jardetzky C. D., J. Am. Chem. Soc., **84**, 62 (1962).
20. Jardetzky C. D., Jardetzky O., J. Am. Chem. Soc., **82**, 222 (1960).
21. Catlin L., Davis J. C., J. Am. Chem. Soc., **84**, 4464 (1962).
22. Fromageot H. P. M., Griffin R. E., Reese C. B., Sulston J. E., Tretham D. R., Tetrahedron, **22**, 705 (1965).
23. Jardetzky C. D., J. Am. Chem. Soc., **82**, 229 (1960).
24. Sundaralingam M., J. Am. Chem. Soc., **87**, 599 (1965).

25. Harris D. R., Macintyre W. M., Biophys. J., **1964**, 203.
26. Iball J., Morgan C. H., Wilson H. R., Nature, 209, 1230 (1966).
27. Camerman N., Trotter J., Acta Cryst., **18**, 203 (1965).
28. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., Acta cryst., **19**, 125 (1965).
29. Jardetzky C. D., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2919 (1961).
30. Donohue J., Trueblood K., J. Mol. Biol., **2**, 363 (1960).
31. Haschemeyer A. E. V., Rich A., J. Mol. Biol., **27**, 369 (1967).
32. Jordan F., Pullman B., Theoret. Chim. Acta, **9**, 242 (1968).
33. Emerson T. R., Swan R. J., Ulbricht T. L. V., Biochemistry, **6**, 842 (1967).
34. Yang J. T., Samejima T., Sarkar P. K., Biopolymers, 4, 623 (1966).
35. Nishimura T., Shimizu B. Biochim. Biophys. Acta, **157**, 221 (1968).
36. Miles D. W., Robins R. K., Eyring H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **57**, 1138 (1967).
37. Cushley R. J., Watanabe K. A., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **89**, 394 (1967).
38. Schweizer M. P., Broom A. D., Ts'o P. O. P., Hollis D. P., J. Am. Chem. Soc., **90**, 1042 (1968).
39. Hampton A., J. Org. Chem., **32**, 1688 (1967).
40. Ikehara M., Kaneko M., Muneyama K., Tanaka K., Tetrahedron Letters, **1967**, 3977.
41. Ikehara M., Kaneko M., Sagai M. Chem. Pharm. Bull., **16**, 1151 (1968).
42. Klee W. A., Mudd S. H., Biochemistry, **6**, 988 (1967).
43. Gushelbauer V., Courteis Y., FEBS Letters, **1**, 183 (1968).
44. Ulbricht T. L. V., Jeningg J. P., Scopes P. M., Klyne M., Tetrahedron Letters, **1964**, 695.
45. Fox J. J., Cavalieri L. F., Chang N., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4315 (1953).
46. Lewin S., Humphreys D. A., J. Chem. Soc. (B), **1966**, 210.
47. Wierzchowsky K. L., Shugar D., Biochim. Biophys. Acta, **25**, 355 (1957); Acta Biochim. Polon., **8**, 219 (1961).
48. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., ДАН СССР, **159**, 609 (1964).
49. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., ДАН СССР, **172**, 603 (1967).
50. Witzel H., Ann., **635**, 182 (1960).
51. Witzel H., in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», v. 2, Davidson D. N., Cohn W. E. (eds.), Acad. Press, N. Y., 1963, p. 221.
52. Gassen H. G., Witzel H., Europ. J. Biochem., **1**, 36 (1967).
53. Broom A. D., Schweizer M. P., Ts'o P. O. P., J. Am. Chem. Soc., **89**, 3612 (1967).
54. Brahms J., Maurizot J. C., Michelson A. M., J. Mol. Biol., **25**, 481 (1967).
55. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Биохимия, **28**, 741 (1963).
56. Соколова Н. И., Стумбравичуте Э. А., Пурыгин П. П., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., ДАН СССР, **174**, 722 (1967).
57. Weber G., J. chim. phys., **55**, 878 (1958).
58. Velick S. F., J. Biol. Chem., **233**, 1455 (1958).
59. Meyer W. L., Mahler H. R., Baker B. R., Biochim. Biophys. Acta, **64**, 353 (1962).
60. Jardetzky O., Wade-Jardetzky N. G., J. Biol. Chem., **241**, 85 (1966).
61. Pfleiderer G., Woenckhaus G., Scholz K., Feller H., Ann., **675**, 205 (1964).
62. Pfleiderer G., Woenckhaus C. W., Ann., **690**, 170 (1965).
63. Bessey O. A., Lowry O. H., Love R. H., J. Biol. Chem., **180**, 755 (1949).

64. Weber G., Biochem. J., **47**, 114 (1950).
65. Chassy B. M., McCormick D. B., Biochemistry, **4**, 2612 (1965).
66. Tsibris I. C. M., McCormick D. B., Wright L. B., Biochemistry, 504 (1965).
67. Rohrer D., Sundaralingam M., Chem. Comm., 1968, 746.
68. Donohue J., Arch. Biochem. Biophys., **128**, 591 (1968).
69. Saenger W., Scheit K. H., Angew. Chem., **81**, 121 (1969).
70. Miles D. W., Hahn S. J., Robins R. K., Robins M. J., Eyring H., J. Phys. Chem., **72**, 1483 (1968).
71. Feldman I., Agarwal R. P., J. Am. Chem. Soc., **90**, 7329 (1968).
72. Hart P. A., Davis J. P., J. Am. Chem. Soc., **91**, 512 (1969).

10 Зак. 614

ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА И РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ МОНОМЕРНЫХ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

I. ВВЕДЕНИЕ

Специфичность функционирования нуклеиновых кислот и нуклеотидкоферментов определяется реакционной способностью нуклеозидных звеньев и в первую очередь входящих в их состав гетероциклических оснований. При этом реакционную способность следует понимать в самом широком смысле, имея в виду не только взаимодействия, приводящие к образованию или разрыву ковалентных связей, но и взаимодействия иных типов — с соседними основаниями в той же полинуклеотидной цепи или с комплементарными основаниями другого полинуклеотида, с белками (гистонами, белками вирусной оболочки, ферментами нуклеинового обмена и т. д.), ионами металлов и т. д.

Для изучения химических свойств компонентов нуклеиновых кислот используется весь арсенал классической и современной органической химии — как теоретические квантовохимические расчеты, так и эмпирические методы, основанные на изучении реакционной способности аналогов. В данной главе с этой точки зрения рассматриваются основные характеристики компонентов нуклеиновых кислот и нуклеотидкоферментов, определяющие их химическую специфичность в основном электронном состоянии. Свойства компонентов нуклеиновых кислот в возбужденном состоянии будут рассмотрены в гл. 12.

II. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ В ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЯХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Свойства молекул определяются особенностями их электронной структуры, и поэтому, прежде чем обсуждать вопросы, связанные с реакционной способностью гетероциклических оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот, необходимо рассмотреть вопрос о распределении электронной плотности в молекулах оснований. При этом мы остановимся на теоретической стороне проблемы и, поневоле более кратко, на немногочисленных экспе-

риментальных попытках подтверждения данных положений. Поскольку таутомерное равновесие оснований обычно очень сильно сдвинуто в сторону одной из форм (см. стр. 165 и далее), которая, видимо, и является ответственной за свойства соединения, здесь мы рассмотрим вопрос о распределении электронов главным образом в наиболее стабильных при обычных условиях (25° С, 1 *ат*)

Рис. 3.1. Способы участия в сопряжении атомов азота и кислорода гетероциклических оснований:

а — Атом азота образует три σ-связи с атомами X, Y и Z. На *p*-орбите азота, перекрывающейся с *p* орбитой атома Z, находятся два электрона. На рис. 3.3 соответствующие атомы азота отмечены знаком „δ+".

б — Атом азота образует две σ-связи с атомами Y и Z. На *p*-орбите азота, перекрывающейся с *p*-орбитой атома Z, находится один электрон. На *n*-орбите, расположенной под углом 120° к связям N—Y и N—Z, находятся два несвязывающих электрона. Соответствующие атомы азота на рис. 3.3 отмечены знаком „δ−".

в — Атом кислорода образует две σ-связи с атомами Z и Y. На *p*-орбите кислорода, перекрывающейся с *p*-орбитой атома Z, расположены два электрона. На несвязывающей *n*-орбите, расположенной под углом 120° к связям Z—O и O—Y; находятся два несвязывающих электрона. Соответствующие атомы кислорода на рис. 3.3 имеют „δ+" (образующий две σ-связи атом серы участвует в сопряжении аналогично).

г — Атом кислорода образует одну σ-связь. На *p*-орбите кислорода, перекрывающейся с *p*-орбитой атома Z, находится один электрон. На двух несвязывающих *n*-орбитах, расположенных под углом 120° по отношению друг к другу и к связи O—Z, находятся по два *n*-электрона. Соответствующие атомы в основаниях на рис. 3.3 имеют „δ−" (атом серы, образующий одну σ-связь, также вносит в сопряженную систему один электрон).

таутомерных формах оснований. Кроме того, хотя протонирование или депротонирование с образованием соответственно катиона или аниона может заметно менять распределение электронов в молекулах оснований, в данном разделе рассматриваются только нейтральные основания, так как почти все теоретические расчеты проведены именно для этой формы. Рассмотрение нейтральных молекул дает значительную информацию при изучении различных химических свойств оснований, в том числе и в ионизованном состоянии.

1. Теоретические положения

Гетероциклические основания как сопряженные системы. Пуриновые и пиримидиновые основания нуклеиновых кислот представляют собой циклические системы, составленные из связанных между собой тригональных (sp^2-гибридизованных) атомов, *p*-электронные атомные орбитали которых, перекрываясь, образуют π-электронные молекулярные орбитали. В соответствии с общепри-

нятыми представлениями[1–3] о способах сопряжения sp^2-гибридизованных гетероатомов атом азота, который в рассматриваемых соединениях связан с тремя другими атомами, вносит в общую π-электронную систему два электрона и не имеет несвязывающих орбит или n-орбит (рис. 3.1). Такими атомами являются, например, атомы азота экзоциклических аминогрупп в цитозине, аденине или гуанине.

Атом азота, связанный лишь с двумя другими атомами, т. е. имеющий две σ-связи, вносит в общую систему всего один π-электрон, и на его несвязывающей орбите находятся два электрона. Примером таких атомов могут являться атомы N-3 цитозина (рис. 3.2) и N-7 гуанина и аденина.

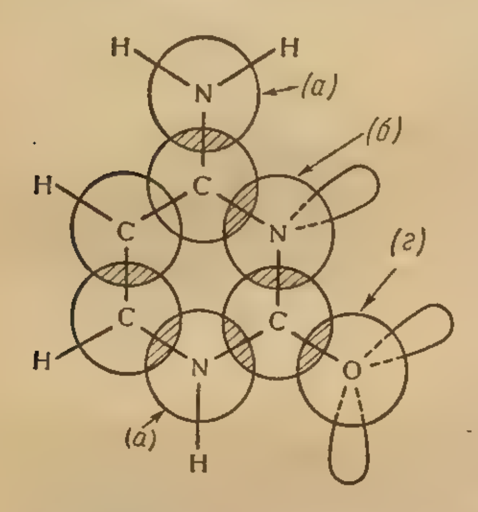


Рис. 3.2. Молекула цитозина как пример сопряженной системы с гетероатомами типа *а*, *б* и *г* (см. рис. 3.1).

Аналогично образующий две σ-связи атом кислорода вносит в систему два p-электрона и имеет два электрона на одной несвязывающей орбите; образующий одну σ-связь карбонильный кислород отдает в общее пользование лишь один электрон и имеет на двух несвязывающих орбитах по два электрона. Участвующий в сопряжении атом углерода вносит в общую π-электронную систему один электрон. Естественно, что свойства соединений определяются распределением и π-, и n-, и σ-электронов. Однако во многих случаях, а именно для процессов, проходящих без разрыва σ-связей, основную роль играют более лабильные π-электроны. Здесь нужно иметь в виду, что они взаимодействуют определенным образом с σ-электронами, однако этим взаимодействием в первом приближении можно пренебречь и рассматривать π- и σ-электронные системы по отдельности.

Даже чисто качественное рассмотрение роли отдельных атомов в сопряжении позволяет сделать ряд довольно важных выводов о химических свойствах оснований (рис. 3.3). В частности, те атомы, которые вносят в общую π-электронную систему два электрона — типы *а* и *в* по обозначениям рис. 3.1, — должны иметь некоторый недостаток электронов или, иными словами, на них должен быть сосредоточен частичный положительный заряд $\delta+$. Атомы, вносящие в систему один p-электрон и имеющие на несвязывающей орбите два электрона (по обозначениям рис. 3.1, типы *б* и *г*), должны обладать частичным отрицательным зарядом $\delta-$ (рис. 3.3). В соответствии с этим первые атомы должны значи-

тельно менее охотно взаимодействовать с электрофильными агентами, чем вторые.

Распределение π-электронной плотности. Качественную картину распределения электронной плотности в молекуле можно получить путем построения мезомерных структур[4]. При этом

Рис. 3.3. Сопряжение гетероатомов в таутомерных формах производных гетероциклических оснований нуклеиновых кислот.

оказывается, в частности, что электронная плотность в пиримидиновых основаниях повышена на С-5 по сравнению с С-6 и что атом С-8 пуриновых оснований должен обладать некоторым недостатком электронов. Хотя даже качественные выводы часто оказываются чрезвычайно полезными при трактовке химического поведения молекул, предпочтительным, естественно, является количественный, или хотя бы полуколичественный, анализ, который

можно провести расчетным путем. В применении к основаниям нуклеиновых кислот для расчетов используются обычно различные варианты метода молекулярных орбиталей в приближении линейной комбинации атомных орбиталей. Еще недавно единственными доступными данными были результаты, полученные при использовании простейшего метода — метода Хюккеля[2, 5, 6]. Метод является полуэмпирическим, так как при расчетах используются ранее подобранные в соответствии с экспериментом или на основании общих соображений параметры и результаты расчета сильно зависят от их величины, которая, в свою очередь, часто выбирается довольно произвольно. Поэтому хотя, как правило, наиболее фундаментальные выводы, сделанные на основании расчетов, проведенных различными авторами, согласуются между собой, часто наблюдаются не только количественные, но и качественные расхождения в результатах, касающихся более частных проблем. Информация, получаемая в результате такого расчета, касается плотности π-электронов на отдельных атомах, участвующих в сопряжении, порядков связей между двумя связанными атомами (эти порядки характеризуют плотность электронного облака между атомами) и распределения энергетических уровней молекулы. Результаты расчета представляются в виде молекулярной диаграммы. На скелете молекулы вдоль связей указывают их подвижные порядки, а рядом со скелетными и *экзо*-атомами в скобках — плотности π-электронов около них.

На рис. 3.4 представлены молекулярные диаграммы некоторых наиболее важных таутомерных форм гетероциклических оснований нуклеиновых кислот (свободных оснований и в составе различных производных), полученные Пюльманом[2] с использованием метода Хюккеля *. Пользуясь приведенными на молекулярных диаграммах электронными плотностями на атомах, легко рассчитать величины частичных зарядов ($\delta+$ или $\delta-$) на соответствующих атомах путем вычитания из числа электронов, поставляемых данным атомом в общую π-систему, величины π-электронной плотности на этом атоме. При этом получается более наглядная картина роли данного атома как электроположительного или электроотрицательного центра в молекуле. Соответствующие диаграммы, полученные расчетом по методу Хюккеля, приведены на рис. 3.5; полученные методом самосогласованного поля — на рис. 3.6. Легко видеть, что качественные предсказания, сделанные на основании построения мезомерных структур, подтверждаются и при расчетах методом молекулярных орбиталей в приближении Хюккеля. Среди углеродных атомов ядер пиримидиновых оснований

* Метод Хюккеля не учитывает взаимодействия электронов в молекуле. Этот недостаток частично устраняется в усовершенствованных методах, например методах самосогласованного поля[7, 8].

Рис. 3.4. Молекулярные диаграммы некоторых таутомерных форм оснований нуклеиновых кислот (свободных оснований и в составе различных производных).

Рядом с диаграммами приведены схемы распределения π-электронов по молекулярным энергетическим уровням в условных единицах энергии β (разность энергий между двумя разрешенными энергетическими уровнями в этилене равна 2β). Незаполненные электронные орбитали обозначены знаком „ — “, электронные орбитали, на которых находятся два электрона с противоположными спинами, — знаком „↓↑“.

Рис. 3.5. Распределение частичных („суммарных“) зарядов на скелетных и экзоатомах некоторых таутомерных форм оснований нуклеиновых кислот (свободных оснований и их производных), рассчитанное по методу молекулярных орбиталей в приближении Хюккеля [2].

частичным положительным зарядом обладают С-2, С-4 и С-6, тогда как на С-5 сосредоточен довольно значительный частичный отрицательный заряд. Значительные по величине частичные положительные заряды расположены на С-2 и С-6 и существенно меньший — на С-8 пуриновых оснований. Группы, поставляющие по два π-электрона в систему (например, NH_2, OH и др.), несут ча-

Рис. 3.6. Распределение частичных („суммарных") зарядов π-электронов в скелетных и экзоатомах кетоаминоформ оснований нуклеиновых кислот (свободных оснований и их производных), рассчитанное по методу самосогласованного поля [7].

стичные положительные заряды, гетероатомы, поставляющие по одному π-электрону, несут значительные частичные отрицательные заряды. Эти выводы о распределении электронной плотности подтверждаются и в расчетах, проведенных тем же методом другими авторами [5, 6], а также при расчетах более совершенными методами (см., например, [7, 8]) *. Выводы, сделанные на основании расчетов, имеют большое значение для предсказания реакционной способности молекул оснований.

Тем не менее нельзя не отметить, что в расчетах различных авторов наблюдаются порой и значительные расхождения. Это

* Имеются работы (см., например, [9]), где вследствие неудачного выбора эмпирических параметров при расчетах методами, еще находящимися в стадии разработки, получаются результаты, не согласующиеся ни с расчетами, выполненными другими методами, ни с экспериментальными данными.

относится как к упрощенному методу молекулярных орбиталей, так и к более совершенным методикам. Хотя в последнем случае, по-видимому, получаются более удовлетворительные энергетические характеристики молекулы, электронные плотности в расчетах разных авторов остаются различными как по численным значениям,

Рис. 3.7. Распределение σ-электронных зарядов для кетоаминоформ оснований унклеиновых кислот [7].

так и по относительным величинам. В качестве примера можно сопоставить полученный при расчете порядок увеличения электронной плотности на атомах азота пиридинового типа в аминоформе аденина:

Упрощенный метод молекулярных орбиталей [13]	N-7 >	N-1 >	N-3
Метод самосогласованного поля по В. А. Куприевичу [10]	N-7 >	N-1 >	N-3
То же, по Пюльману [11] . . .	N-7 >	N-3 >	N-1
То же, по Нагата и сотр. [12] .	N-1 >	N-3 >	N-7
То же, по Гиесне-Претре [7] . .	N-1 >	N-7 >	N-3

Эти и другие наблюдаемые расхождения связаны, очевидно, с несовершенством методов расчета и со значительной произвольностью в выборе исходных параметров. Можно надеяться, что развитие теоретических представлений и техники расчета в конце концов даст возможность более надежно предсказывать распределение электронной плотности, пока же, очевидно, следует ориентироваться только на те результаты, которые воспроизводятся

-0,223 NH_2 +0,324 -0,163 N -0,344 +0,190 +0,422 -0,175 N O -0,419 H
цитозин

O -0,356 -0,010 H_3C +0,366 -0,233 -0,119 NH +0,149 +0,466 -0,181 N O -0,377 H
тимин

-0,236 NH_2 -0,223 N +0,266 -0,039 N -0,264 +0,170 +0,197 +0,207 -0,123 N N -0,257 H
аденин

O -0,379 -0,172 N +0,355 -0,210 -0,095 NH +0,119 +0,221 +0,406 -0,103 N N NH_2 -0,373 -0,245 H
гуанин

Рис. 3.8. Суммарные π- и σ-заряды для кетоаминоформ оснований нуклеиновых кислот [7].

при расчете по различным методам. Именно этого принципа мы придерживаемся при дальнейшем изложении вопросов, связанных с химическими свойствами оснований.

Учет σ-электронов и суммарное распределение электронной плотности. Многие физические свойства оснований, например дипольные моменты, зависят и от π-электронных, и от σ-электронных характеристик молекулы. Очевидно, это относится также к химическим свойствам оснований, которые связаны с разрывами σ-связей. Поэтому знание распределения σ-электронов в молекуле чрезвычайно важно. На рис. 3.7 приведено распределение электронной плотности в основаниях нуклеиновых кислот для σ-электронов и на рис. 3.8 — распределение суммарных зарядов [7].

Как легко видеть, качественное распределение зарядов при включении в расчет σ-электронов остается тем же, что и при рассмотрении только π-электронов (см. рис. 3.6). Так, например, можно сопоставить заряды на атомах С-5 и С-6 пиримидиновых оснований, рассчитанные только с учетом π-электронов и с учетом π- и σ-электронов. В обоих случаях бóльшая электронная плотность соответствует атому С-5. Далее оба расчета предсказывают, что на С-6 аденина и цитозина сосредоточены частичные положительные заряды и т. д. Возможно, что для предсказания химических особенностей оснований расчеты с учетом σ-электронов окажутся более подходящими, однако в настоящее время они малодоступны.

2. Экспериментальные данные и их сопоставление с расчетными

Для того чтобы выбрать лучший метод расчета, необходимо иметь совокупность экспериментальных данных для проверки получаемых результатов. Распределение электронной плотности определяет, очевидно, такие характеристики молекул, как длина связей, дипольные моменты, химические сдвиги (при измерении ЯМР), структуру сигналов ЭПР и ядерного квадрупольного резонанса.

Рентгеноструктурный анализ. Данные рентгенографии кристаллических веществ дают возможность определить длины связей в молекуле соединений. Длины связей, определяемые по данным рентгеноструктурного анализа, могут быть сопоставлены с длинами связей, рассчитанными теоретически, исходя из порядков связей[8].

В табл. 3.1 приводится в качестве примера сопоставление величин длин связей в молекуле непротонированного цитозина, найденных экспериментально[14] и расчетных[15].

Таблица 3.1 **Сопоставление расчетных[15] и экспериментальных[14] длин связей в молекуле непротонированного цитозина**

Связь	Порядок связи	Расчетная длина связи, Å	Найденная длина связи, Å
N-1—C-2	0,38	1,38	1,376
N-1—C-6	0,53	1,36	1,361
C-2—2-*экзо*-O	0,78	1,24	1,260
C-2—N-3	0,48	1,38	1,354
C-4—N-3	0,64	1,33	1,351
C-4—C-5	0,53	1,41	1,432
C-4—4-*экзо*-N	0,47	1,36	1,332
C-5—C-6	0,76	1,38	1,348

Наблюдается достаточно хорошее качественное соответствие. Это позволяет считать, что расчеты дают картину распределения электронных плотностей, которая по крайней мере качественно отражает истинное распределение*. Из данных табл. 3.1 видно также, что с увеличением порядка связей их длина уменьшается.

Спектры ЯМР. Химические сдвиги протонов в спектрах ЯМР различных соединений зависят от электронной плотности на атомах, с которыми они связаны. Для бензоидных систем наблюдается довольно хорошая корреляция между π-электронной плотностью, рассчитанной для какого-либо атома, и величиной химического сдвига протона, связанного с этим атомом[17–20]. Попытки провести подобное сопоставление экспериментально найденных значений химических сдвигов протонов при С-2, С-6 и С-8 пурина с электронными плотностями на этих атомах углерода были значительно менее успешны[21–25]. Такой результат становится, однако, понятным, если учесть, что в данном случае на величине химического сдвига должен сильно сказываться эффект поля соседних гетероатомов, обладающих высоким частичным отрицательным зарядом, а также то обстоятельство, что влияние магнитной анизотропии цикла различно для протонов, занимающих разное положение в цикле. Если, используя вычисленные величины зарядов на атомах, провести расчеты значений химических сдвигов, учитывая все указанные эффекты, то удается правильно предсказать порядок возрастания величин химического сдвига в пурине: δ(С-8) $<$ δ(С-2) $<$ δ(С-6)[25]. Тем не менее в качестве метода исследования распределения электронной плотности в молекулах таких сложных соединений, как основания нуклеиновых кислот, ЯМР-спектроскопия, по-видимому, малоэффективна.

Исследование дипольных моментов. В то время как данные рентгеноструктурного анализа и ЯМР дают возможность делать выводы о состоянии отдельных атомов в молекуле, дипольный момент определяется электронной структурой молекулы в целом[26]. К сожалению, в литературе имеется очень мало сведений о дипольных моментах гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, поэтому широких сопоставлений провести не удается. Однако рассчитанные с учетом эффекта σ-электронов величины дипольных моментов ряда оснований довольно хорошо совпадают с найденными значениями (табл. 3.2)[27].

Таким образом, справедливость расчетов электронной плотности для оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот, в настоящее время может быть проверена лишь косвенным образом. При этом оказывается, что количественные результаты не очень хорошо согласуются как между собой (когда они получены

---

* Рентгеноструктурные данные по другим основаниям — см. гл. 2; расчетные величины — см.[1, 3, 5–12, 16].

различными методами расчета), так и с экспериментальными данными. Тем не менее ряд фундаментальных качественных выводов, которые можно сделать на основании расчетных данных, вполне согласуются с наблюдаемыми результатами (например, при сопоставлении порядков и длин связей, при предсказании реакционной способности, величин дипольных моментов и т. д.).

Таблица 3.2 **Дипольные моменты некоторых гетероциклических соединений** [27, 29, 30—32, 37]

Учет эффекта σ-связей проводился по [28]

Соединение	Дипольные моменты, D			
	рассчитанные			найденные
	μ_π	μ_σ	$\mu_{сумм}$	
Пиримидин	0,87	1,50	2,37	2,42
9-Метилпурин	3,53	0,73	4,26	4,3
9-Метиладенин	2,70	0,37	3,06	3,0
1,3-Диметилурацил	3,28	0,86	3,94	3,9
5-Бромурацил	3,20	1,45	3,98	4,5±0,3

Представляется достаточно вероятным поэтому, что в основном качественная картина распределения электронов, полученная посредством расчетов, недалека от истинной.

III. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Энергетические характеристики молекул в отличие от картины распределения электронной плотности определяются с помощью квантовохимических расчетов достаточно точно. Для химиков наибольший интерес представляют такие энергетические характеристики соединений, как энергия резонанса и энергия высшего занятого и низшего свободного уровня, смысл и значимость которых кратко рассмотрены ниже.

Как уже было отмечено, в результате расчетов электронных свойств молекулы методом молекулярных орбиталей получается набор разрешенных энергетических уровней, на которых могут располагаться π-электроны. Естественно, что в основном состоянии молекулы электроны занимают уровни с минимально возможной энергией, причем на каждой молекулярной орбитали, которой соответствует данный энергетический уровень, располагается по два электрона с противоположными спинами (см. рис. 3.4). Общая энергия π-электронов в соответствии с этим равна удвоенной сумме энергий занятых уровней.

1. Энергия резонанса *

Для расчета энергии резонанса каждый π-электрон вначале рассматривается как делокализованный, т. е. принадлежащий всей молекуле в целом, и рассчитывается суммарная энергия таких делокализованных электронов. Если, с другой стороны, рассматривать молекулу как соединение, состоящее из ординарных и локализованных, не взаимодействующих друг с другом двойных связей, как это условно изображается при классическом написании ее формулы, и рассчитать сумму энергий π-электронов ее отдельных двойных связей, то эта энергия оказывается заметно выше, чем у соответствующей молекулы с делокализованными электронами. Разность между этими, рассчитанными для данной молекулы, энергиями носит название энергии резонанса (энергии делокализации), и ее величина может характеризовать стабильность молекулы в целом. Поскольку энергия резонанса зависит от числа электронов, участвующих в сопряжении, более подходящей характеристикой увеличения стабильности за счет сопряжения является «приведенная» энергия резонанса — энергия резонанса в расчете на один делокализованный электрон[34]. Молекула, для которой величина приведенной энергии резонанса более высока, при прочих равных условиях более стабильна, чем молекула с более низкой приведенной энергией резонанса. Ниже приводятся вычисленные двумя методами величины энергии резонанса некоторых оснований нуклеиновых кислот в расчете на один π-электрон[11]:

	По методу молекулярных орбиталей единицы β	По методу самосогласованного поля эв
Урацил	0,19	0,260
Цитозин	0,23	0,373
Аденин	0,32	0,904
Гуанин	0,27	0,446

Эти значения убывают в ряду

аденин > гуанин > цитозин > урацил

Отсюда должно следовать, что во всякого рода превращениях под действием физических факторов или под влиянием химических агентов ядро аденина должно быть наиболее стабильным; это действительно и наблюдается.

Значения энергии резонанса могут быть использованы при оценке относительной стабильности различных таутомерных форм (см. стр. 163), а также при изучении различных равновесных превращений. Однако, к сожалению, расчетные величины энергии

* Обзоры — см. [33–35].

резонанса оснований нуклеиновых кислот в настоящее время вряд ли могут быть подвергнуты непосредственной экспериментальной проверке[36, 37].

2. Энергия высшего занятого и низшего свободного уровней[38, 39]

Энергия высшей занятой орбитали непосредственно связана с легкостью удаления электронов из молекулы: чем она выше, тем легче может быть удален электрон с образованием катиона. Энергия низшей свободной орбитали, наоборот, характеризует легкость присоединения электрона — чем ниже лежит соответствующий энергетический уровень, тем легче молекула присоединяет электрон, становясь анионом. Расчеты, проведенные с использованием различных методов, дают для энергий высшего занятого уровня следующие ряды:

по Пюльману[39]

гуанин > аденин > тимин > цитозин > урацил

по Фернандесу-Алонсо[6]

гуанин > тимин > аденин > урацил > цитозин

по Нагата[12]

гуанин > аденин > цитозин > урацил > тимин

по В. В. Куприевичу[10] и Гиесне-Претре[7]

гуанин > аденин > цитозин > тимин > урацил

Таким образом, при оценке энергий высшего занятого уровня все приведенные расчеты показывают, что лучшим донором электронов из всех оснований должен быть гуанин, а худшими — урацил и тимин; пурины в общем являются лучшими донорами, чем пиримидины.

Значения энергии высшего занятого уровня могут быть сопоставлены с экспериментальными значениями потенциала ионизации (табл. 3.3).

Таблица 3.3 **Энергия высшего занятого уровня и потенциалы ионизации некоторых пуриновых и пиримидиновых оснований[40]**

Соединение	Потенциал ионизации, эв	Энергия высшего занятого уровня, эв	Соединение	Потенциал ионизации, эв	Энергия высшего занятого уровня, эв
6-Азаурацил	10,18	9,65	Ксантин	9,30	8,82
Урацил	9,82	9,15	Гипоксантин	9,17	8,00
Пурин	9,68	8,87	Аденин	8,91	7,92
Тимин	9,43	8,80	Цитозин	8,90	8,16

Другим возможным способом экспериментальной проверки значений энергии высшего занятого и низшего свободного электронного уровней является полярографическое исследование оснований. В процессе полярографии происходит передача электронов соединения электроду (окисление) или, наоборот, переход электронов от электрода к соединению (восстановление). Легкость процессов может быть непосредственно сопоставлена с высотой соответственно высшего занятого и низшего свободного электронных уровней. При этом оказывается, что полярографическое окисление также дает результаты, в основном согласующиеся с предсказываемыми теоретически. Так, на графитовом электроде все пуриновые основания, за исключением самого пурина, дают окислительную волну, причем гуанин окисляется легче, чем аденин [39]. Таким образом, электронодонорные свойства оснований нуклеиновых кислот, по-видимому, достаточно хорошо предсказываются теоретически на основании современных представлений, особенно при использовании усовершенствованных методов расчета.

Менее согласующиеся результаты получаются при оценке энергии низшего свободного электронного уровня оснований, которая определяет электроноакцепторные свойства. Расчеты, проведенные с использованием различных методов, дают для энергии низшего свободного уровня следующие ряды:

по Пюльману [11, 39]

цитозин < аденин < тимин < урацил < гуанин

по Пюльману [11] (усовершенствованная методика)

аденин < цитозин < урацил < тимин < гуанин

по В. А. Куприевичу [10]

цитозин < урацил < тимин < гуанин < аденин

по Нагата [12]

тимин < урацил < цитозин < гуанин < аденин

Получающиеся ряды различаются настолько сильно, что в настоящее время делать какие-либо выводы или предсказания относительно электроноакцепторных свойств оснований не представляется возможным.

Таким образом, результаты квантовохимических расчетов, полученные с использованием разных методов, совпадают между собой в наиболее существенных выводах, однако в целом ряде деталей они зачастую приводят к противоречивым результатам. Поэтому не стоит переоценивать предсказательную способность современных теоретических методов. Вместе с тем вне всякого сомнения, они могут служить отправной точкой при проведении экспериментальных исследований и полезным подспорьем при трактовке получаемых результатов.

IV. ТАУТОМЕРИЯ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Одной из важнейших проблем химии нуклеиновых оснований является проблема их таутомерии. Так, одна из наиболее общепринятых теорий спонтанного возникновения мутаций основана на возможности существования оснований в различных таутомерных формах. Действительно, можно ожидать, например, что цитозин в аминоформе должен по своей электронной структуре образовывать комплементарную пару с гуанином, тогда как в иминоформе — с аденином; тимин (урацил) в дикетоформе должен образовывать пару с аденином, а в таутомерной 4-оксиформе — с гуанином. Та же картина должна наблюдаться и для производных оснований.

R—атом водорода или различные радикалы

Это предположение остается пока еще не более чем гипотезой, но тем не менее оно очень привлекательно и указывает один из путей изучения проблемы матричного синтеза — поиск корреляций между таутомерной формой того или иного основания и его ролью в процессе биосинтеза.

Различные таутомерные формы оснований должны, естественно, обладать различной реакционной способностью. Если можно до некоторой степени судить о реакционной способности истинных (чистых) таутомерных форм соединений по реакционной способности их моделей, то становится очевидным резкое различие в поведении различных таутомерных форм. В качестве примера можно сопоставить поведение уридина и 1-(β-*D*-рибозил)-4-этоксидигидропиримидона-2 (модель редкой таутомерной 4-оксиформы уридина) по отношению к нуклеофильным агентам. Если уридин в нейтральной среде довольно инертен, то его аналог

легко реагирует с самыми различными агентами[41–42] и служит благодаря этому чрезвычайно полезным промежуточным продуктом при синтезе разнообразных аналогов нуклеозидов.

В данном разделе мы кратко остановимся на проблеме таутомерии оснований нуклеиновых кислот, затронув сначала теоретическую сторону проблемы и затем экспериментальные доказательства существования тех или иных таутомерных форм оснований и их равновесия. Пользуясь тем, что общие проблемы таутомерии гетероциклических соединений достаточно подробно рассмотрены в превосходном обзоре Катрицкого[43], мы остановимся на более частных проблемах, связанных с таутомерией оснований нуклеиновых кислот в составе нуклеозидов, обращаясь к самим основаниям только в случае необходимости подтвердить выводы, сделанные для нуклеозида, или когда данные для нуклеозидов отсутствуют.

1. Теоретические положения

Каждое основание, входящее в состав нуклеиновых кислот, вообще говоря, может существовать в нескольких таутомерных формах, число которых зависит от числа экзоциклических групп в пуриновом или пиримидиновом цикле.

Известно (см., например,[43] или[44]), что гетероциклические окси- и аминосоединения существуют в основном (при обычных условиях) в кето- и аминных таутомерных формах. Как будет показано ниже, основания нуклеиновых кислот в этом смысле не представляют исключения. При рассмотрении a priori вопроса о том, какая из таутомерных форм будет более стабильна в данных условиях, следует учитывать несколько факторов, определяющих свободную энергию реакции перехода соединения из одной таутомерной формы в другую и, следовательно, константу равновесия этой реакции. Во-первых, при изменении таутомерной формы происходит перестройка системы σ-связей молекулы. Во-вторых, меняется структура π-электронной системы в сопряженных молекулах и, следовательно, их энергия резонанса. В-третьих, меняется степень сольватированности молекулы, если рассматривается таутомерное равновесие в растворах, представляющее наибольший интерес для решения химических и биохимических проблем. И, наконец, в-четвертых, при переходе соединения из одной таутомерной формы в другую меняется система внутримолекулярных водородных связей. Суммарное действие этих факторов и определяет относительную стабильность различных таутомерных форм при данных условиях. Для первоначальной ориентировки можно теоретически оценить относительную стабильность различных таутомерных форм, пренебрегая разной степенью их сольватации. При этом для каждой таутомерной формы можно либо, исходя из экспериментальных данных по энергии изолированных

связей, представленных в канонической формуле, рассчитать энергию молекулы в целом и затем добавить к ней вычисленную квантовохимическим путем энергию резонанса, либо провести полный квантовохимический расчет с учетом π- и σ-связей. Оценка значений энергии резонанса, рассчитанных для таутомерных окси- и кетоформ при стандартных условиях (25° С, 1 *ат*), приводит к заключению, что оксиформы являются более выгодными (табл. 3.4). Однако, с другой стороны, расчет энергии молекулы по изолированным связям соответствующих таутомерных форм показывает, что при стандартных условиях кетоформы значительно стабильнее оксиформ, причем разность суммарных энергий изолированных связей для кето- и оксиформ больше разности соответствующих значений энергии резонанса. Таким образом, с точки зрения энергии связей в таутомерном равновесии оснований нуклеиновых кислот при стандартных условиях кетоформы должны преобладать над оксиформами.

Таблица 3.4 **Суммарная энергия изолированных связей и энергия резонанса для окси- и кетоформ оснований**

Основание	Суммарная энергия изолированных связей [45], *ккал/моль*			Энергия резонанса *, *ккал/моль*		
	для оксиформы	для кетоформы	Δ	для оксиформы	для кетоформы	Δ
Гипоксантин	1123	1140	17	75	68	7
Гуанин	1257	1275	18	83	77	6
Цитозин	1035	1053	18	53	46	7
Урацил	998 (4-оксиформа)	1015,8	18	43 (4-оксиформа)	38	5

* Пересчитано из данных [34].

В случае амино-иминного равновесия энергии σ-связей в двух таутомерных формах можно принять одинаковыми; в таком случае стабильность этих форм может определяться соотношением энергий резонанса. Расчеты, проведенные с помощью метода молекулярных орбиталей в приближении Хюккеля [34], показывают, что энергия резонанса аминоформы выше, чем энергия резонанса иминоформы, и, следовательно, первая является более стабильной *.

* Имеются работы, где расчеты простым методом молекулярных орбиталей дают противоречивые результаты (см., например, [5]). Результаты расчетов данным методом сильно зависят от выбора параметров. Этого недостатка в значительной степени удается избежать при использовании более современных методов расчета (см., например, [10–12]).

Расчеты, проведенные с учетом влияния σ-электронов[46], также дают возможность сделать выбор в пользу кето- и аминоформ (при стандартных условиях).

Таблица 3.5 **Расчетная энергия перехода таутомерных форм некоторых оснований нуклеиновых кислот** [46]

Основание	Тип таутомерного равновесия	ΔH, *эв*	Основание	Тип таутомерного равновесия	ΔH, *эв*
Аденин	Амино-иминное	1,477	Тимин	Кето-енольное	0,345
Цитозин	»	0,550	Урацил	4-Кето- — 4-окси-	0,329
Гуанин	Кето-енольное	0,185			

В табл. 3.5 приведены значения энергии перехода из кетоформы в енольную и из амино- в иминоформу для оснований нуклеиновых кислот. Из этих данных следует, что наиболее сильно таутомерное равновесие в сторону аминоформы сдвинуто в случае аденина; сдвиг в сторону более стабильной формы для амино-иминного равновесия выражен сильнее, чем аналогичный сдвиг в случае кето-енольной таутомерии. Эти выводы согласуются с экспериментальными данными, которые для ряда оснований приводятся ниже.

2. Экспериментальные данные

Уридин и тимидин

Теоретически оба эти соединения могут существовать в виде трех таутомерных форм:

R — остаток рибозы или 2'-дезоксирибозы

R' = H или CH_3

С помощью рентгенографии[47] было показано, что в кристаллическом состоянии урацил существует в дикетоформе. Однако, как уже отмечалось, данные, полученные для кристаллических веществ, нельзя непосредственно переносить на состояние их в растворе; в связи с этим необходимо рассмотреть экспериментальные данные, относящиеся к растворам.

УФ-Спектры. Сравнение УФ-спектров урацила, 1-метил-, 3-метил- и 1,3-диметилурацилов[48] в воде при pH 7,2 (рис. 3.9) показывает, что при переходе от урацила к 1-метилурацилу и от 3-метилурацила к 1,3-диметилурацилу наблюдается совершенно одинаковый батохромный сдвиг и одинаковые характерные изменения в молярном коэффициенте экстинкции. Две метильные группы в 1,3-диметилурациле оказывают аддитивное действие на характер спектра. Различие между кривыми поглощения этих четырех соединений сводятся только к аддитивным эффектам метильных групп. Отсюда следует, что все четыре соединения существуют в одинаковой таутомерной форме, т. е. дикетоформе. Такой вывод подтверждается сильным отличием спектра этих соединений от спектра 1-метил-4-этоксидигидропиримидона-2. Аналогично УФ-спектры уридина и 3-метилуридина (в водных растворах) чрезвычайно схожи (λ_{max} 262 *ммк*), тогда как спектр 4-этокси-1-глюкопиранозилдигидропиримидона-2 сильно отличается от них (λ_{max} 273 *ммк*)[49]. Таким образом, из данных УФ-спектров следует, что и урацил, и уридин в водных растворах существуют в дикетоформе.

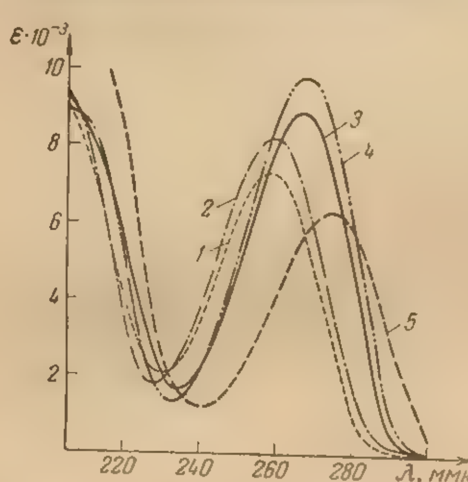


Рис. 3.9. УФ-Спектры производных урацила (водные растворы, pH 7,2)[48]:

1 — 3-метилурацила; *2* — урацила; *3* — 1,3-диметилурацила; *4* — 1-метилурацила; *5* — 1-метил-4-этоксидигидропиримидинона 2

ИК-Спектры. Еще более точную информацию можно получить из сопоставления ИК-спектров изучаемого соединения и модельных фиксированных таутомерных форм. В работах Милса[49, 50] было проведено сопоставление ИК-спектров уридина, 3-метилуридина, 1-(β-*D*-глюкопиранозил)-урацила, 1-(β-*D*-глюкопиранозил)-4-этоксидигидропиримидона-2, уридин-5′-фосфата и аналогичных производных тимина в тяжелой воде (табл. 3.6). Из этих данных видно, что спектры урацила и тимина, замещенных в положении 1 сахарным остатком, и спектры соответствующих 3-метилпроизводных очень близки и заметно отличаются от спектров 4-оксипроизводных. Это означает, что все подобные производные урацила и тимина при выбранных условиях в D_2O существуют в дикетоформе. К подобному же выводу привели и более поздние исследования[51–52] (см. также[52] для кристаллических соединений). Анджел отмечает[51], что ИК-спектры нуклеозидов в твердом состоянии и в водных растворах практически одинаковы.

Спектры ЯМР. Спектры ЯМР при исследовании в неводных растворителях дают возможность определить место локализации подвижных протонов. В случае уридина и тимидина в спектре ЯМР, полученном в диметилсульфоксиде в области химических сдвигов примерно 11 м. д., наблюдается пик, площадь которого соответствует одному протону, и который является резонансным сигналом протона N—H. Это означает, что в данных условиях тимидин и уридин существуют в дикетоформе[53, 61].

Таблица 3.6. **ИК-Спектры различных производных урацила и тимина в D_2O**[49, 50]

Соединение	Характеристические полосы, *мк* *
Уридин	5,92 (*s*); 6,05 (*vs*); 6,19 (*m*); 6,84 (*s*); 7,18 (*m*); 7,74 (*m*)
3-Метилуридин	5,90 (*s*); 6,04 (*vs*); 6,20(*s*); 6,80 (*s*); 7,05 (*w*); 7,25 (*w*); 7,73 (*w*)
1-(β-*D*-Глюкопиранозил)-урацил	5,91 (*vs*); 6,04 (*vs*); 6,17 (*m*); 6,85 (*s*); 7,20 (*m*); 7,55 (*w*); 7,71 (*m*)
1-(β-*D*-Глюкопиранозил)-4-этоксидигидропиримидон-2	6,05 (*vs*); 6,13 (*s*); 6,31 (*w*); 6,49 (*s*); 6,74 (*s*); 6,85 (*s*); 7,21 (*m*); 7,27 (*m*); 7,61 (*vs*); 7,81 (*w*)
Уридин-5′-фосфат	5,96 (*s*); 6,0 (*vs*); 6,21 (*m*); 6,85 (*s*); 7,07 (*vw*); 7,20 (*m*); 7,73 (*m*)
Тимидин	5,97 (*s, sh*); 6,03 (*vs*); 6,15 (*s*); 6,78 (*m*); 7,33 (*m*); 7,70 (*m*)
1-(β-*D*-Глюкопиранозил)-3-метилурацил	5,90 (*s*); 6,05 (*vs*); 6,19 (*s*)
Дезоксиуридин	5,91 (*s, sh*); 6,01 (*vs*)
3-Метилтимидин	5,93 (*s*); 6,00 (*s*); 6,18 (*vs*)
1-(β-*D*-Глюкопиранозил)-тимин	5,90 (*s*); 6,00 (*vs*); 6,10 (*vs*)
1-(β-*D*-Глюкопиранозил)-3-метилтимин	5,93 (*s*); 6,00 (*s*); 6,16 (*vs*)
1-(β-*D*-Глюкопиранозил)-4-этокси-5-метил-дигидропиримидон-2	— 6.00 (*vs*); 6,15 (*s*)

* Рядом с указанием длины волны полосы в скобках приведена характеристика ее интенсивности (*vs* — очень интенсивная полоса, *s* — интенсивная, *m* — средней интенсивности, *w* — слабая; *sh* — полоса в виде плеча на другой полосе; *vw* — очень слабая; *s, sh* — интенсивная полоса в виде плеча на другой полосе).

Таким образом, вся совокупность экспериментальных данных свидетельствует о преобладании в производных уридина как в кристаллическом состоянии, так и в водных и неводных растворах дикетопиримидиновой структуры. Однако нет оснований утверждать, что эта таутомерная форма единственно возможная для данных соединений. Количество другой таутомерной формы (или форм) может быть настолько малым, что физические методы в их

сегодняшнем состоянии не позволяют обнаружить ее содержания. Вместе с тем решение многих проблем требует знания констант таутомерного равновесия между возможными таутомерными формами. Поскольку перечисленные выше физические методы не дают информации о величине таких констант, единственным возможным методом их оценки является сопоставление величин констант ионизации фиксированных моделей таутомерных форм[43]. Подобный подход применим в случае, когда изучаемые таутомерные формы дают катион или анион одинакового строения. Равновесие между обеими таутомерными формами и общей ионизированной формой может быть записано в виде

$$H^+ + XH \xrightleftharpoons[k_{XH}]{} HXH^+ \xrightleftharpoons[]{k_{HX}} HX + H^+ \qquad H^+ + XH \underset{}{\overset{K_T}{\rightleftharpoons}} HX + H^+$$

$$K_{XH} = \frac{[H^+][XH]}{[HXH^+]} \qquad K_{HX} = \frac{[H^+][HX]}{[HXH^+]} \qquad (1)$$

Здесь XH и HX — две таутомерные формы, отличающиеся положением протона; K_T — константа таутомерного равновесия. При этом наблюдаемая экспериментально константа ионизации равна

$$K_{набл} = \frac{[H^+]([XH] + [HX])}{[HXH^+]} \qquad (2)$$

Сопоставление выражений для трех констант ионизации дает:

$$K_{набл} = K_{XH} + K_{HX}$$

Из определения $K_T = [XH]/[HX]$ очевидно, что $K_T = K_{XH}/K_{HX}$. Следовательно, если известна константа ионизации исследуемого соединения и константа ионизации хотя бы одной из таутомерных форм, можно определить константу таутомерного равновесия. Константу ионизации одной из форм обычно определяют с помощью модели, в которой определенная таутомерная форма фиксирована посредством введения заместителя, находящегося у соответствующего атома, например путем введения метильной группы (предполагая, что метильная группа не очень сильно меняет константу ионизации по сравнению с истинной таутомерной формой). В случае производных урацила применение этого подхода, однако, довольно затруднительно, поскольку в щелочной среде О-алкильные производные уридина, являющиеся моделями его таутомерных форм, не диссоциируют, а константа диссоциации его в кислой области очень мала. Константы ионизации модельных метилированных соединений были определены Катрицким[54]. Ниже приводятся значения pK'_a ряда модельных пиримидинов производных

урацила (в концентрированных водных растворах серной кислоты)[54]:

	pK'_a
Урацил	−3,38
1-Метилурацил	−3,40
5-Бромурацил	−7,25
1-Метил-5-бромурацил	−6,60
1,3-Диметилурацил	−3,25
1 3-Диметил-5-бромурацил	−6,44
4-Этоксидигидропиримидон-2	+1,00
1-Метил-4-метоксидигидропиримидон-2	+0,65
1-Метил-4-метокси-5-бромдигидропиримидон-2	−3,32

Из этих данных можно вычислить константу таутомерного равновесия, которая оказывается равной $10^{4,0}$, что свидетельствует в пользу дикетоформы *. Интересно отметить, что введение такого электроотрицательного заместителя, как бром, в положение 5 пиримидинового цикла заметно сдвигает равновесие в сторону енольной формы. В этом случае $K_т$ составляет $10^{3,3}$. Полученные данные, несмотря на относительную неточность, показывают, что в исследуемых условиях равновесие чрезвычайно сильно сдвинуто в сторону дикетоструктуры, и объясняют невозможность (на сегодняшний день) обнаружения минорных таутомерных форм экспериментальным путем.

Цитидин

Цитидин может, очевидно, существовать в виде трех таутомерных форм I—III ($R = R' = R'' = H$):

NR′₂ ... N ... N ... O ... R I
NR′ ... N—R″ ... N ... O ... R II
NR′ ... N ... N ... OR″ ... R III

Из данных рентгеноструктурного анализа следует, что цитидин в кристаллическом состоянии существует в аминоформе[56]. Исследование структуры цитидина в водных и неводных растворителях проведено различными методами.

УФ-Спектры. Сопоставление УФ-спектров нейтральных форм 1-метилцитозина и 4-имино-2-метокси-1-метил-1,4-дигидропирими-

* Этот результат может расцениваться лишь как приближенный[54], ввиду того что определение рK производилось в среде очень концентрированной серной кислоты с помощью функции кислотности Гамметта H_0[55], которая определяется уравнением $H_0 = \lg(B/BH^+) - pK_a$. Однако экспериментально определенный угол наклона зависимости $\lg(B/BH^+)$ от H_0 сильно отличался от единицы. Определение константы таутомерного равновесия другим способом дает для $K_т$ значение $10^{3,3}$.

дина, являющегося моделью таутомерной формы III, позволяет заключить, что она не является преобладающей в таутомерном равновесии (табл. 3.7). Однако на основании УФ-спектров не представляется возможным сделать выбор между формами I и II, поскольку спектры 1-метилцитозина, 1-метил-4-*экзо*-N,N-диметиламинодигидропиримидона-2 (модельное соединение формы I) и 1,3-диметилцитозина (модельное соединение формы II) довольно близки между собой.

Таблица 3.7. **УФ-Спектры нейтральных форм производных цитозина**[57, 58]

Соединение	Формула	Среда	λ_{max}, *ммк*	lg ε_{max}
1-Метилцитозин	I (R=Me, R′=H)	pH 7,0	274 230 (плечо)	3,92 3,89
		Этанол, 10^{-2} *M* NaOH	275	3,94
1,3-Диметилцитозин	II (R=R″=Me, R′=H)	pH 11,5	273 225	3,94 4,0
4-Имино-2-метокси-1-метил-1,4-дигидропиримидин	III (R=R″=Me, R′=H)	Этанол, 10^{-2} *M* NaOH	275 (плечо) 246	3,78 4,16
1-Метил-4-*экзо*-N,N-диметиламинодигидропиримидон-2	I (R=R′=Me)	pH 7,0	282 219 (плечо)	4,08 4,04

ИК-Спектры. Растворы цитидина, дезоксицитидина и 1-(β-*D*-глюкопиранозил)-4-*экзо*-N,N-диметиламинодигидропиримидона-2 в D_2O имеют близкие ИК-спектры в области карбонильных колебаний (табл. 3.8)[50].

Таблица 3.8. **ИК-Спектры гликозидных производных цитозина в D_2O**[50]

Соединение	Характеристические полосы, *мк*		
Цитидин	6,08	6,21	—
Дезоксицитидин	6,05	6,15	—
1-(β-*D*-Глюкопиранозил)-4-*экзо*-N, N-диметиламинодигидропиримидон-2	6,09	6,15	6,50

Однако поскольку последнее соединение имеет фиксированную кетоструктуру, то цитидин также, по-видимому, обладает кетоструктурой. Тщательное отнесение полос в спектре цитидина и его производных позволяет выделить полосы колебаний, связан-

ных с аминогруппой[51] и карбонильной группой, и приписать цитидину и его аналогам кетоаминоструктуру.

Спектры ЯМР. Кетоаминоструктура цитидина сохраняется и в неводных растворителях, как это следует из изучения спектров ЯМР. Так, в диметилсульфоксиде в области $\delta \approx 7{,}5$ м. д. наблюдается характерный для ароматической аминогруппы пик, соответствующий двум протонам[53], тогда как пик протона N—H в области 11 м. д. не наблюдается. Это хорошо видно при сравнении спектра ЯМР цитидина со спектрами тимидина или уридина (см. выше). Отсюда следует, что в диметилсульфоксиде цитидин имеет аминоструктуру. Спектры основания в дезоксицитидине и цитидине совершенно аналогичны[59, 60], так что таутомерная структура этих двух соединений одинакова *.

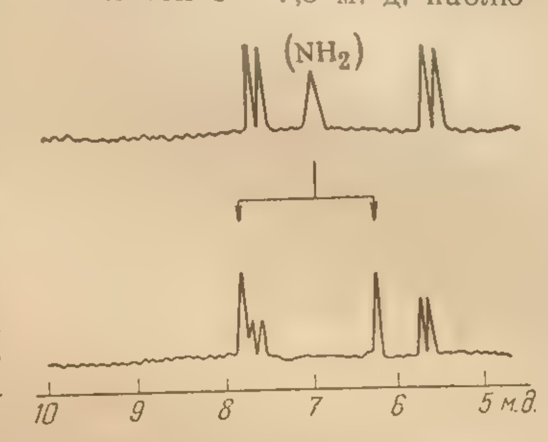


Рис. 3.10. Спектры ЯМР растворов * 1-метилцитозина (верхняя кривая) и 1-метил-4-*экзо*-^{15}N-цитозина (нижняя кривая) в диметилсульфоксиде при 23° С[62].

* Здесь и далее, если особо не оговорен используемый растворитель, имеются в виду водные растворы соединений.

Окончательным доказательством справедливости этих выводов является сравнение ЯМР спектров 1-метилцитозина и 1-метил-4-*экзо*-^{15}N-цитозина[62] (рис. 3.10).

В спектре меченного тяжелым азотом соединения пик, соответствующий протонам, связанным с азотом (или азотами) ядра, расщепляется на два симметричных пика. Это с несомненностью доказывает принадлежность обоих протонов к экзоциклической аминогруппе, а не к двум иминогруппам — циклической и экзоциклической. Таким образом, в настоящее время не вызывает сомнения, что различные производные цитозина в кристаллическом состоянии и в растворах присутствуют (практически полностью) в кетоаминоформе.

По данным ряда исследований, кетоаминоструктура является преобладающей также и для аналогов цитидина, например 6-азацитидина[63, 64] и 5-азацитидина[65].

Значения р*K*. Степень преобладания в водных растворах производных цитидина таутомерной кетоаминоформы можно оценить

* В одной из работ[61] цитидину и дезоксицитидину были приписаны разные таутомерные структуры (амино- и имино- соответственно). Однако, как было показано позднее[59, 60], различие в спектрах ЯМР, на которых основывался этот вывод, обусловлено тем обстоятельством, что сравнивались цитидин в нейтральной форме и протонированный дезоксицитидин.

из данных по основности моделей таутомерных форм, в частности из известных[66] констант диссоциации 1,4-*экзо*-N,N-триметилцитозина (pK'_a 4,20) и 1,3-диметилцитозина (pK'_a 9,29). Поскольку УФ-спектры катионных форм этих соединений свидетельствуют об их одинаковом строении, удалось определить константу таутомерного равновесия (см. стр. 168), которая оказывается равной приблизительно 10^5. Можно сравнить константы таутомерного равновесия,

Таблица 3.9. **Значения pK'_a различных метилированных производных цитозина и цитидина**

Соединение	pK'_a	Литература
1-Метилцитозин	4,55	*67*
1,3-Диметилцитозин	9,4	*68*
	9,29	*66*
1,4-*экзо*-N,N-Триметилцитозин	4,20	*66*
Цитидин	4,1	*67*
3-Метилцитидин	8,7	*68*
4-*экзо*-N-N-Диметилцитидин	3,62	*67*

вычисленные исходя из различных моделей. В табл. 3.9 приведены значения pK'_a метилированных производных цитидина и соответствующих производных 1-метилцитозина. Из этих данных можно определить значение константы таутомерного равновесия амино- и иминоформ цитозина, сопоставив результаты для 1-метилцитозина и 1,3-диметилцитозина ($K_т$ $10^{4,9}$) или для 1,3-диметилцитозина и 1,4-*экзо*-N,N-триметилцитозина ($K_т$ 10^5), а также константу таутомерного равновесия цитидина, сопоставив данные для цитидина и 3-метилцитидина ($K_т$ $10^{4,6}$) и для 3-метилцитидина и 4-*экзо*-N,N-диметилцитидина ($K_т$ $10^{5,1}$). Все полученные таким образом значения констант равновесия близки между собой и свидетельствуют о сильном смещении равновесия в сторону аминоформы.

Сопоставление значений константы таутомерного равновесия цитидина и уридина показывает, что в случае уридина содержание редкой формы примерно в 5—10 раз выше, чем в случае цитидина (в водных растворах при обычных условиях). Это согласуется и с данными квантовохимических расчетов, предсказывающими более легкий таутомерный переход в случае уридина (см. стр. 165) по сравнению с цитидином.

Таким образом, количество таутомерной формы II в растворе цитидина очень мало. Однако приводимые до сих пор доказательства преобладания кетоаминоформы не исключают существования заметных количеств таутомерной формы III, и имеются доводы в пользу того, что пренебрегать этой формой нельзя[58, 69, 70].

Они основаны, в частности, на одинаковом фотохимическом поведении 1-метил-2-метокси-4-иминодигидропиримидина (являющегося моделью формы III) и 1-метилцитозина в этаноле при УФ-облучении — оба соединения подвергаются фотохимическому превращению — в то время как 1,3-диметилцитозин остается в этих условиях неизменным. Наиболее эффективная длина волны, при которой происходит указанное фотохимическое превращение, близка к длине волны максимума адсорбции в спектре 1-метил-2-метокси-4-иминодигидропиримидина ($\sim$240 *ммк*)[58]. Необходимы, однако, дополнительные данные, чтобы сделать окончательный вывод о вкладе таутомерной формы III.

Значительный интерес представляют исследования аналогов природных нуклеотидов, поскольку они должны помочь выявить факторы, влияющие на таутомерное равновесие. В этой связи необходимо остановиться на изучении таутомерного равновесия в случае 4-*экзо*-N-окси и 4-*экзо*-N-аминоцитозинов[71].

IVa $\underset{}{\overset{K_т}{\rightleftarrows}}$ IVб — pK'_a 2,7; V — pK'_a 2,9; VI — pK'_a 3,8; VII — pK'_a 3,85

VIIIa $\overset{K_т}{\rightleftarrows}$ VIIIб — pK'_a 4,85; IX — pK'_a 6,30; X — pK'_a 5,0

Соединения IV—VII и VIII—X дают катионы одинаковой структуры, как следует из их УФ-спектров, и константы таутомерного равновесия для этих соединений могут быть оценены исходя из значений констант ионизации, соответствующих различным таутомерным формам. При этом оказалось, что $K_т$ между IVa и IVб равна примерно 10, а для перехода между VIIIa и VIIIб значение $K_т$ составляет $^1/_{30}$. Создается впечатление, что с увеличением электроотрицательности заместителя у атома азота (H- < NH_2- < OH-) равновесие сдвигается в сторону иминоформы.

Таким образом, модификация пиримидинового ядра путем введения электроотрицательных заместителей в положение 5 уридина (см. стр. 169) или в экзоциклическую аминогруппу цитидина заметно сдвигает таутомерное равновесие в сторону минорных форм.

Влияние насыщения связи С-5—С-6 в молекуле пиримидиновых оснований на таутомерное равновесие. В химии и биологии нуклеиновых кислот важную роль играет насыщение связи С-5—С-6 в молекуле пиримидиновых оснований, что происходит, например, при облучении нуклеиновых кислот УФ-светом (см. гл. 12), часто применяемом при функциональных и особенно при генетических исследованиях. Сравнение характеристических полос[50] в ИК-спектрах 5,6-дигидроуридина и 5,6-дигидротимидина с ИК-спектром 3-метил-5,6-дигидроуридина в D_2O дает следующую картину:

	λ, *мк*	
5,6-Дигидроуридин	5,85;	5,98
5,6-Дигидротимидин	5,88;	6,00
3-Метил-5,6-дигидроуридин	5,85;	6,02

Из приведенных данных очевидно, что преобладание дикетоструктуры и в этом случае сохраняется. Такой вывод подтверждается и рентгенографическими исследованиями структуры дигидротимина[72].

Более сложный случай представляет изучение таутомерного равновесия дигидроцитозина, поскольку это соединение нестабильно. Тем не менее данные по ЯМР- и УФ-спектроскопии соединений

XIa ⇄ XIб XII

pK'_a 6,62 pK'_a 8,05

XI—XII приводят к заключению[73], что в водных растворах таутомерное равновесие для этих соединений сдвинуто в сторону аминоформы. Сравнение pK_a соединений XI и XII дает возможность оценить $K_т$ между XIa и XIб; она равна ~25. Сравнение этой величины с соответствующим значением $K_т$ для цитидина показывает, что в первом случае имеет место сильный сдвиг в сторону иминоформы. Такой вывод согласуется и с результатами квантово-химических расчетов[74] значений энергии резонанса таутомерных форм дигидроцитозина.

Таким образом, вся совокупность имеющихся в настоящее время не слишком многочисленных данных приводит к предположению,

что любое из известных на сегодня изменений в химической структуре природных оснований заметно сдвигает таутомерное равновесие (в обычных условиях) в сторону редких форм. Трудно пока судить, связано ли это с односторонним характером имеющихся результатов или же является общей закономерностью. Если это общая закономерность, то она дает веский довод в пользу гипотезы о важной роли таутомерии в биогенезе нуклеиновых кислот. Возможно, что в процессе эволюции основания, способные к слишком частым переходам из одной таутомерной формы в другую, отбрасывались, так как они приводили к излишне большой изменчивости. С этой точки зрения исследование таутомерных превращений приобретает особый интерес.

Гуанозин и инозин

При изучении таутомерного равновесия пуриновых оснований нуклеиновых кислот использование УФ-спектров дает лишь незначительную информацию, поскольку спектры различных закрепленных таутомерных форм мало отличаются друг от друга [75].

Таблица 3.10. **ИК-Спектры производных гуанозина и инозина в D_2O[76, 78]**

Соединение	Характеристические частоты, *мк*		
Гуанозин	6,00	6,34	6,37
1,9-Диметилгуанин	5,98	6,28	6,46
9-(β-*D*-Рибофуранозил)-2-амино-6-метоксипурин	6,18	6,27	6,54
Инозин	5,97	—	—
1-Бензилинозин	5,97	—	—
9-(β-*D*-Рибофуранозил)-6-метоксипурин	6,21	6,28	—

ИК-спектры. Сравнение спектров гуанозина, 1,9-диметилгуанина и 9-(β-*D*-рибофуранозил)-2-амино-6-метоксипурина в D_2O показывает близкое сходство в случае первых двух соединений и заметное отличие для третьего соединения, в спектре которого исчезает карбонильная полоса 6—6,25 *мк* (табл. 3,10)*. Аналогичную картину можно наблюдать в случае инозина: наличие полосы 5,97 *мк* в спектре инозина и его 1-бензильного производного и ее исчезновение при переходе к енольной модели указывает на преобладание кетоструктуры в случае инозина. Аминоструктура гуанозина установлена на основании идентификации в кристаллическом

* Полоса 6,2 *мк* в спектре гуанозина и 5,9 *мк* для инозина идентифицирована как карбонильная на основании ИК-спектров 6-^{18}O-нуклеозидов [77].

состоянии полос, соответствующих NH_2-группе, с помощью метода дейтерирования [51].

Данные, полученные на пуриновых нуклеозидах и нуклеотидах, совпадают с данными, полученными на основаниях [75].

Спектры ЯМР. Сравнение спектров ЯМР гуанозина и 1,9-диметилгуанина (рис. 3.11) в диметилсульфоксиде приводит к выводу, что однопротонный сигнал в области химических сдвигов 11—12 м. д. в спектре гуанозина соответствует протону, связанному с атомом азота N-1. Синглетный двухпротонный сигнал в области ~7 м. д. соответствует легко обменивающимся протонам [53, 61]. Нерасщепленность этого сигнала означает, что оба протона связаны с одним и тем же атомом, которым может быть только экзоциклический азот. Все это свидетельствует в пользу кетоаминоструктуры гуанозина в диметилсульфоксиде [76].

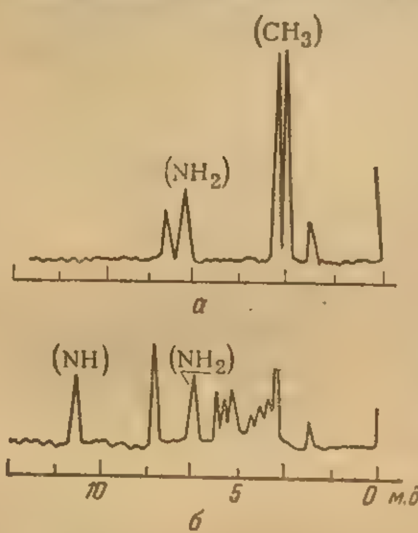


Рис. 3.11. Спектры ЯМР 1,9-диметилгуанина (*а*) и гуанозина (*б*) в дейтеродиметилсульфоксиде.

К сожалению, данные по константам таутомерного равновесия для гуанозина отсутствуют, однако исходя из квантовохимических расчетов (стр. 165) можно полагать, что равновесие здесь должно быть смещено в сторону енольной формы сильнее, чем в случае уридина.

Аденозин

Аденозин может существовать в двух таутомерных: амино- или иминоформах. Аналогия ИК-спектров 9-(β-*D*-рибофуранозил)-6-*экзо*-N,N-диметиламинопурина и аденозин-5′-фосфата (мононатриевой соли) [50] в D_2O дает возможность предполагать, что в водном растворе аденозин существует в виде аминосоединения. В кристаллическом состоянии аминоструктура аденозина сохраняется, как это следует из рентгеноструктурных данных [79] и ИК-спектров кристаллического соединения [51]. В спектре ЯМР аденозина и дезоксиаденозина в диметилсульфоксиде наблюдается характерный двухпротонный сигнал аминогруппы в области 7,5 м. д. и не наблюдается сигналов других протонов, способных к обмену с растворителем [53, 61]. Это означает, что и в диметилсульфоксиде аденозин существует в аминоформе. Если предположить, что амино- и иминоформы аденозина дают при протонировании один и тот же катион, то константа таутомерного равновесия в воде может быть оценена из значений pK'_a 6-*экзо*-N,N-диметиламинопуринрибозида

(3,62 при ионной силе $\mu = 0{,}5$) и 1-N-метиладенозина (8,25 при $\mu = 0{,}5$). Такая оценка[143] дает величину $K_т \approx 4 \cdot 10^4$.

Таким образом, теоретические представления, приводящие к заключению о кетоаминоструктуре оснований нуклеиновых кислот, полностью подтверждаются экспериментально. Во всех исследованных случаях равновесие чрезвычайно сильно сдвинуто в сторону преобладающей таутомерной формы, так что оптическими методами не удается обнаружить редких форм соединений.

V. КОНСТАНТЫ ИОНИЗАЦИИ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Общие положения

Установление преобладания той или иной таутомерной формы еще недостаточно для понимания химических свойств оснований. Как правило, все реакции оснований происходят в растворах и во многих из них принимают участие протонированные (катионные) или депротонированные (анионные) формы оснований. В кислой среде основания могут протонироваться путем равновесного превращения:

$$BH^+ \rightleftarrows B + H^+ \tag{3}$$

Тогда «основная» константа ионизации будет записываться в виде

$$K^0_{1a} = \frac{(B)(H^+)}{(BH^+)} \tag{4}$$

где (B), (H^+) и (BH^+) — активности соответствующих компонентов.

В щелочной среде основания теряют протон в соответствии с равновесием:

$$BH \underset{}{\overset{K_a}{\rightleftarrows}} B^- + H^+ \tag{5}$$

«Кислая» константа диссоциации записывается в виде

$$K^0_{2a} = \frac{(B^-)(H^+)}{(BH)} \tag{6}$$

Определенные через активности константы ионизации называют истинными или термодинамическими константами и они характеризуют кислотно-основные свойства оснований в бесконечно разбавленных растворах. На практике определяют так называемые кажущиеся константы ионизации, которые выражаются через концентрации изучаемого соединения и зависят от присутствия других соединений в растворе. В частности, при наиболее часто используемых в химии нуклеиновых кислот потенциометрических и спек-

трофотометрических определениях значений констант ионизации эмпирически найденные величины определяются уравнениями:

$$K'_{1a} = \frac{(H^+)\,[B]}{[BH^+]} = \frac{(B)\,(H^+)}{(BH^+)} \cdot \frac{f_{BH^+}}{f_B} \qquad (7)$$

$$K'_{2a} = \frac{(H^+)\,[B^-]}{[BH]} = \frac{(B^-)\,(H^+)}{(BH)} \cdot \frac{f_{BH}}{f_{B^-}} \qquad (8)$$

Здесь величины в квадратных скобках соответствуют концентрациям компонентов, участвующих в равновесии, в круглых — их активностям, а f — коэффициенты активности.

Для определения истинных констант равновесия необходима экстраполяция к бесконечному разбавлению. Несколько более подробно эта проблема рассматривается на стр. 190. Константы равновесия принято характеризовать величиной

$$pK_a = -\lg K_a$$

Одни из оснований нуклеиновых кислот обладают выраженными основными свойствами и протонируются в слабокислой среде, но депротонируются лишь в сильнощелочной; другие основания, наоборот, являются слабыми кислотами и, образуя анионы в слабоосновной среде, протонируются только в сильнокислой. К первой группе принадлежат цитозин и аденин; относящиеся к ним значения pK_a связаны с уравнениями (3) и (4). Ко второй группе относятся тимин и урацил, и их обычные значения pK_a связаны с уравнениями (5) и (6). Гипоксантин, ксантин и гуанин занимают промежуточное положение; они протонируются при сравнительно высоких для этих соединений значениях pH согласно уравнению (3) и депротонируются согласно уравнению (5) при довольно низких для этих соединений величинах pH в щелочной области. В соответствии с этим их кислотно-основные свойства описываются двумя величинами pK_a, из которых одна связана с первым процессом, а другая — со вторым.

2. Локализация присоединения и отщепления протонов в нуклеозидах и нуклеотидах

Естественно ожидать, что протон должен присоединяться к тем атомам в молекуле, на которых сосредоточен наибольший частичный отрицательный заряд, обусловленный π-электронами, т. е. к атомам азота, образующим две σ-связи. Эти атомы обладают, кроме того, неподеленной электронной парой, что, в свою очередь, должно облегчать протонирование. Экзоциклические атомы азота, образующие три σ-связи, во-первых, как показано на рис. 3.5, несут частичный положительный заряд. Во-вторых, присоединение про-

тона к таким атомам потребовало бы выведения из сопряжения пары электронов, расположенной на *p*-орбитали (см. стр. 147 и рис. 3.1), т. е. дополнительных затрат энергии.

В соответствии с этими представлениями возможными местами протонирования (взяты в кружок) в преобладающих таутомерных формах оснований являются N-3 в цитозине; N-1, N-3 и N-7 в аденине; N-3 и N-7 в гуанине и гипоксантине и N-7 в ксантине. То же относится и к производным оснований.

R—атом водорода или различные радикалы

Однако на основании распределения только π-электронной плотности выбор преимущественного (из нескольких возможных) места протонирования сделать не удается, поскольку в процессе принимают участие несвязывающие электроны неподеленных пар. В связи с этим Пюльман и Накаяма разработали метод расчета, в котором учитываются неподеленные электроны[80]. Такой расчет правильно предсказывает, что присоединение протона преимущественно должно происходить по N-1 аденина и по N-7 гуанина и гипоксантина.

При выбранном подходе не учитывается влияние на ионизацию основания среды, в которой происходит протонирование, а также влияние целого ряда эффектов, связанных с сольватацией и различными внутримолекулярными взаимодействиями.

Данные рентгеноструктурного анализа подтверждают правильность выводов о месте присоединения протонов к основаниям кристаллических протонированных оснований, нуклеозидов и нуклеотидов.

Результаты рентгеноструктурного анализа показывают, что в катионе аденииния как таковом[82], а также в составе аденозин-3′-фосфата[83] или аденозин-5′-фосфата[84] протон присоединен к атому азота N-1. В случае гуанина был сделан вывод о присоединении протона к N-7[85], и, наконец, на основании данных для цитидин-3′-фосфата[86, 87] и 5-карбоксиметилцитозина[88] протон в катионе цитозиния был локализован при N-3.

Справедливость выводов, сделанных исходя из теоретических соображений, а также рентгеноструктурного анализа, подтверждается совокупностью спектральных данных для растворов соединений. Наиболее убедительные доказательства связаны, как правило, с синтезом моделей и сопоставлением их спектральных

характеристик с аналогичными для протонированной молекулы. Основываясь на изучении УФ-спектров оснований и их производных, Дэккер в своем обзоре [89] приводит ряд аргументов, позволяющих уточнить локализацию протонов в ионизованных соединениях. Здесь лишь кратко суммируем его положения:

1. УФ-Спектры катионных форм 7-метилгуанина и 7-метилдезоксигуанозин-5′-фосфата аналогичны спектрам протонированных гуанина и дезоксигуанозин-5′-фосфата. Следовательно, вероятно протонирование по N-7 гуанина.

2. Спектры 3-N-метил- и 7-N-метиладенозинов в катионной форме несхожи со спектром протонированного аденозина, и, следовательно, в случае последнего соединения наиболее вероятно присоединение протона по N-1.

3. Сравнение спектров катионных форм цитидина, 1,3-диметилцитозина и 2-*экзо*-O, 2′-циклоцитидина показывает большое сходство спектров первых двух соединений, тогда как спектр третьего сильно отличается от них. Это, очевидно означает, что из двух возможных мест присоединения протона — по карбонильному кислороду или по азоту N-3 — для цитидина в основном реализуется присоединением по N-3.

Еще более убедительными, чем данные, приводимые Дэккером [89], служат результаты сравнения ИК-спектров катионных форм соединений с закрепленной таутомерной структурой со спектрами соответствующих протонированных соединений. В монопротонированной форме гуанозин показывает в D_2O ИК-спектр, аналогичный ИК-спектру 1,7,9-триметилгуанина, что указывает на кето-структуру протонированной формы гуанозина. Спектры 7,9-ди-(β-оксиэтил)-гуанина и 1,7,9-триметилгуаниниййодида в катионной форме аналогичны спектру протонированного гуанозина, что свидетельствует о протонировании последнего по N-7 [76].

Характеристическая полоса 1215 *см*$^{-1}$, приписываемая колебаниям C—NH_2, наблюдается и в нейтральной, и в протонированной формах кристаллического аденозина [90]. То же самое относится к двум полосам 3100 и 3300 *см*$^{-1}$, связанным с колебаниями аминогруппы [51]. Это означает, по-видимому, что протон присоединяется по N-1, N-3 или N-7, но не к азоту экзоциклической аминогруппы.

В спектре цитидина при протонировании сохраняется полоса 1285 *см*$^{-1}$, наблюдаемая в нейтральной форме. Эта полоса приписывается колебаниям C—NH_2, и отсутствие сдвига при протонировании означает, что NH_2-группа не затрагивается. Следовательно, наиболее вероятным местом присоединения протона [90] является N-3. Этот вывод подтверждается также и характером изменений в частотах, соответствующих колебаниям C=O, при протонировании цитидина в D_2O и в кристаллическом состоянии [90].

Наконец, ряд доводов в пользу протонирования аденозина по N-1 и гуанозина по N-7, а также доказательство протонирования

цитидина, по крайней мере в неводных растворителях, по N-3 дают данные спектров ЯМР.

Величина химического сдвига протона при С-8 протонированной формы аденозина в D_2O по сравнению с непротонированной составляет 0,2—0,3 м. д. в сторону слабых полей. В то же время химический сдвиг соответствующего протона в протонированном гуанозине по сравнению с непротонированной формой нуклеозида очень велик и составляет 0,95 м. д. в сторону слабых полей [91–93]. Это может служить доводом в пользу протонирования аденозина в пиримидиновом, а гуанозина в имидазольном циклах.

Структура спектров ЯМР катионов цитозиния и 1-метилцитозиния в диметилсульфоксиде [91] и в трифторуксусной кислоте [95] с несомненностью доказывает, что в протонированной молекуле протон присоединен по N-3.

Величина химического сдвига протона при С-8 катиона инозина по сравнению с нейтральной формой этого нуклеозида [93] возможно свидетельствует о том, что в данном случае протонирование протекает так же, как у гуанозина, — по N-7 имидазольного цикла.

Таким образом, в настоящее время уже не вызывает сомнений, что при протонировании в основном образуются указанные выше формы аденина, гуанина и цитозина (или их нуклеозидов и нуклеотидов). Однако совершенно не исключено, что наряду с этими формами присутствуют, пусть в значительно меньших количествах, катионы с протоном, присоединенным по другим положениям молекулы, которые не обнаруживаются в силу недостаточной чувствительности используемых в настоящее время методов.

Доводы в пользу существования других протонированных форм аденина как основания, отличающихся от упомянутой выше основной формы (протонирование по N-1), были недавно приведены [96] на основании изучения спектров флуоресценции метилированных производных аденина при pH 2. Был сделан вывод, что в данном случае протонирование по N-1, хотя и имеет место, однако не объясняет явления флуоресценции, поскольку 1-N-метиладенин, 3-N-метиладенин и 3,7-N,N-диметиладенин не показывают флуоресценции. Высказано предположение, что в этом случае за флуоресценцию ответственен дважды протонированный таутомер — по экзоциклической аминогруппе и по N-7. Тем не менее в случае аденозина флуоресценция может быть объяснена протонированием по N-1, поскольку никаких доказательств или доводов в пользу существования других протонированных таутомерных форм для аденозина не имеется.

3. Локализация зарядов в ионах оснований

Таким образом, можно считать доказанным, что из возможных протонированных форм наибольшую роль играют именно те, существование которых было предсказано теоретически. Однако место

присоединения протона не обязательно соответствует месту локализации положительного заряда в молекуле. Поскольку основания нуклеиновых кислот являются сопряженными молекулами, то положительный заряд в них в значительной мере делокализован, и на каком-либо атоме может оказаться сосредоточенной бо́льшая часть заряда, чем на атоме, к которому присоединен протон. Так, несмотря на то, что в протонированной форме аденина протон присоединен по N-1, положительный заряд в значительно большей степени локализован на экзоциклическом азоте аминогруппы и на атоме N-9 [82].

То же относится и к локализации отрицательного заряда, образующегося при отщеплении протона от нуклеозидов типа уридина или гуанозина. На основании близкой аналогии ИК-спектров гуанозина и его O-метилпроизводного в щелочной среде [76] и исчезновения характеристической полосы колебаний C=O-группы при высоких значениях pH [77] делается вывод о преимущественной локализации отрицательного заряда на кислородном атоме. Этот же вывод можно сделать из аналогии УФ-спектров аниона 9-этилгуанина и 2,6-диаминопурина [97]. По-видимому, эти выводы справедливы также и для инозина.

Аналогия УФ-спектров аниона уридина и его 4-*экзо*-O-алкильного производного приводит к выводу о преимущественной локализации отрицательного заряда на кислородном атоме O-4 [48, 98]. С этим согласуется и близость ИК-спектра уридина в щелочной среде с ИК-спектром дигидропиримидона-2 [99]. Однако для тимидина предложены различные структуры аниона — с локализацией отрицательного заряда на O-2 [99] и на O-4 [48, 98].

В ряде работ (см., например, [90]) для анионов приняты структуры с зарядами на азоте, от которого мигрировал протон, однако, по-видимому, экспериментально более обоснованы представления о локализации большей части отрицательного заряда на кислородных атомах.

Подводя итог сказанному выше, отметим, что если вопрос о преобладании той или иной таутомерной формы и локализации протона в протонированных формах можно считать решенным, то вопрос о распределении электронной плотности в образующихся катионах и анионах пока еще недостаточно ясен. Решение его имеет большое значение для понимания ряда особенностей оснований и в том числе влияния заместителей на их кислотно-основные свойства.

4. Влияние различных факторов на кислотно-основное равновесие оснований

На кислотно-основные свойства оснований, так же как и на таутомерное равновесие, прежде всего влияют структурные особенности самих молекул оснований (наличие заместителей, раз-

личные внутримолекулярные взаимодействия — образование водородных связей, цвиттерионов и т. д.). Кроме того, играют роль и внешние факторы, зависящие от условий проведения эксперимента (температура, ионная сила и т. п.).

Структурные факторы

Роль углеводного остатка. Наиболее известным примером влияния заместителя на кислотно-основные свойства является различие в константах ионизации оснований и их рибо- и дезоксирибопроизводных. Соответствующие константы ионизации приведены в табл. 3.11. Наблюдаемое уменьшение рK_a при переходе от

Таблица 3.11. **Значение рK'_a оснований, дезоксирибонуклеозидов и рибонуклеозидов**

Определения производились спектрофотометрически. Для производных гуанина и аденина в растворе с ионной силой $\mu = 1$; в остальных случаях в 0,1 *М* глициновом или 0,025 *М* ацетатном буферах

Производные	рK'_a основания	Литература	рK'_a дезоксирибонуклеозида	Литература	рK'_a рибонуклеозида	Литература
Урацила	9,5	*100*	9,3	*100*	9,25	*100*
Цитозина	4,46	*100*	4,3	*100*	4,1	*100*
Тимина	9,9	*48*	9,8	*98*	9,68	*101*
Гуанина	—	—	9,33	*102*	9,22	*102*
Гипоксантина	8,94	*103*	—	—	8,75	*103*
Ксантина	7,53	*104*	—	—	5,50	*104*
Аденина	4,1	*102*	3,8	*102*	3,6	*102*

основания к дезоксирибопроизводным и далее к рибопроизводным может быть объяснено индуктивным эффектом (—*I*) остатка сахара, который, очевидно, выше в случае рибозы, чем в случае дезоксирибозы. С этим согласуется заметное уменьшение величины рK'_a в случае 2′-дезокси-2′-фторцитидина по сравнению с цитидином, поскольку фтор обладает заметно большей электроотрицательностью, чем гидроксильная группа. Однако с этой точки зрения остается непонятным изменение рK'_a в серии стереоизомерных пентофуранозилтиминов (табл. 3.12), углеводные остатки которых содержат одинаковое число гидроксильных групп и, следовательно, должны обладать близкими индуктивными эффектами. Возможно, в этом случае какую-то роль играет образование водородной связи между водородом 2′-гидроксильной группы пентозы и атомом кислорода карбонильной группы при С-2 пиримидинового ядра. Доводы за и против существования такой связи в нуклеозидах и нуклеотидах рассмотрены в гл. 2. Разграничить влия-

ние индуктивного эффекта и образования водородной связи на основании имеющихся данных не представляется возможным, поскольку для этого требуется систематическое изучение влияния заместителей в углеводном остатке на величину рK_a.

Таблица 3.12. **Влияние строения углеводного остатка на величину рK'_a производных оснований нуклеиновых кислот**

Соединение	рK'_a	Литература
1-(β-*D*-Рибофуранозил)-тимин	9,68	*101*
1-(β-*D*-Дезоксирибофуранозил)-тимин	9,8	*101*
1-(β-*D*-Ксилофуранозил)-тимин	9,75	*101*
1-(β-*D*-Арабинофуранозил)-тимин	9,8	*101*
1-(β-*D*-Ликсофуранозил)-тимин	9,92	*101*
1-(β-*D*-Рибофуранозил)-5-фторурацил	7,57	*100*
1-(β-*D*-Арабинофуранозил)-5-фторурацил	7,63	*105*
1-(β-*D*-Рибофуранозил)-5-фторцитозин	2,26	*100*
1-(β-*D*-Арабинофуранозил)-5-фторцитозин	2,33	*106*
1-(β-*D*-2′-Дезокси-2′-фторрибофуранозил)-цитозин	3,9	*107*

Роль заместителей в гетероциклическом ядре. Менее изучено влияние заместителей в различных положениях гетероциклических оснований; доступные данные относятся в основном к пиримидиновым производным. Наиболее подробно исследовано влияние заместителей в положении 5 пиримидинового цикла. В табл. 3.13 приведены значения рK'_a некоторых 5-замещенных производных пиримидиновых нуклеозидов.

Таблица 3.13. **Влияние различных заместителей в положении 5 пиримидинового ядра на величину рK'_a нуклеозидов**

Нуклеозид	рK'_a	Литература	Нуклеозид	рK'_a	Литература
Цитидин	4,1	*100*	5-Фтор-2′-дезоксицитидин	2,39	*100*
5-Метилцитидин	4,28	*108*	Уридин	9,5	*100*
5-Фторцитидин	2,26	*100*	Риботимидин	9,68	*101*
2′-Дезоксицитидин	4,3	*100*	5-Фторуридин	7,57	*100*
5-Метил-2′-дезоксицитидин	4,40	*100*			

Легко видеть, что электронодонорные заместители несколько увеличивают значение рK_a, тогда как электроноакцепторные уменьшают основность соединений. Подобного эффекта следовало ожидать, если принять во внимание возможность делокализации заряда в ионизованных основаниях.

В отличие от этого электронодонорные алкильные заместители при введении их в экзоциклические аминогруппы цитидина вызывают понижение рK_a, причем диалкильные производные имеют заметно более низкое значение рK_a, чем моноалкильные производные, как это легко видеть из данных, приведенных в табл. 3.14.

Таблица 3.14. **Зависимости рK'_a производных цитозина от заместителей в экзоциклической аминогруппе**[100]

Измерения проводились в 0,025 *М* ацетатном буфере

Соединение	рK'_a
Цитозин	4,61
4-*экзо*-N-Метилцитозин	4,55
5-Фторцитозин	2,90
5-Фтор-4-*экзо*-N-метилцитозин	2,66
Цитидин	4,1
4-*экзо*-N-Метилцитидин	3,92
4-*экзо*-N, N-Диметилцитидин	3,62
5-Фторцитидин	2,26
5-Фтор-4-*экзо*-N-метилцитидин	2,05
2′-Дезоксицитидин	4,3
4-*экзо*-N-Метилдезоксицитидин	4,01
4-*экзо*-N, N-Диметил-2′-дезоксицитидин	3,79
5-Фтор-2′-дезоксицитидин	2,39
5-Фтор-4-*экзо*-N-метил-2′-дезоксицитидин	2,14
5-Фтор-4-*экзо*-N-диметил-2′-дезоксицитидин	1,89
1-Метилцитозин	4,55
1,4-*экзо*-N-Диметилцитозин	4,47
1,4-*экзо*-N, N-Триметилцитозин	4,20
5-Метил-2′-дезоксицитидин	4,40
4-*экзо*-N,5-Диметил-2′-дезоксицитидин	4,04
4-*экзо*-N-(β-Фенилэтил)-5-метил-2′-дезоксицитидин	3,83

Подобный эффект можно объяснить двумя причинами. Алкильный заместитель может, во-первых, затруднить образование сольватной оболочки вокруг центров локализации положительного заряда в протонированной молекуле и, во-вторых, понизить способность протонированной молекулы к образованию водородных связей с растворителем. Например, для производных цитозина

По-видимому, оба эти эффекта играют существенную роль в стабилизации или дестабилизации катиона.

Ниже приведены значения pK'_a ряда производных цитозина с алкильным заместителем в экзоциклической аминогруппе (в 0,025 *M* ацетатном буфере)[100]:

	pK'_a
Цитозин	4,61
4-*экзо*-N-Метилцитозин	4,55
4-*экзо*-N-Этилцитозин	4,58
4-*экзо*-N-(*н*-Бутил)-цитозин	4,69
5-Фтор-2′-дезоксицитидин	2,39
5-Фтор-4-*экзо*-N-метил-2′-дезоксицитидин	2,14
5-Фтор-4-*экзо*-N-этил-2′-дезоксицитидин	2,21
5-Фтор-4-*экзо*-N-(*н*-пропил)-2′-дезоксицитидин	2,19
5-Фтор-4-*экзо*-N-(*н*-бутил)-2′-дезоксицитидин	2,21

Некоторое возрастание pK'_a при увеличении длины алкильного заместителя — явление, трудно поддающееся объяснению. Возможно, что здесь играет роль индуктивный эффект алкильного радикала (+*I*-), который нарастает при удлинении алкильной цепи.

Обращает на себя внимание большая разность в величинах pK'_a при переходе от 5-метил-2′-дезоксицитидина к 4-*экзо*-N,5-диметил-2′-дезоксицитидину, а именно 0,36 единицы p*K*. Возможно, что в данном случае, наряду со стерическими препятствиями сольватации и с уменьшением числа водородных связей с растворителем, имеет место стерическое взаимодействие 5-метильной и 4-*экзо*-N-метильной групп. В результате такого взаимодействия аминогруппа выводится из плоскости цикла, что, в свою очередь, приводит к нарушению сопряжения. Поскольку аминогруппа является[109] заместителем типа (+*M*- —*I*-)*, то нарушение сопряжения должно приводить к уменьшению величины мезомерного эффекта +*M*-, тогда как индуктивный эффект (—*I*-) остается неизменным. Это увеличивает электроноакцепторные свойства аминогруппы и уменьшает pK_a за счет относительной дестабилизации протонированной формы. Аналогичный эффект наблюдается и в случае производных аденина[110, 111]:

	pK'_a
Аденин	4,22
6-*экзо*-N-Метиладенин	4,18
6-*экзо*-N, N-Диметиладенин	3,87
Аденозин	3,8
6-*экзо*-N-(β-Оксиэтил)-аденозин	3,1

* Заместителями типа (+*M*-, —*I*-) являются электроотрицательные заместители, такие, как азот, кислород, галоиды, отдающие в сопряженную систему два π-электрона (см. стр. 147). Такие заместители оттягивают на себя электроны по системе σ-связей (—*I*-эффект), но являются донорами электронов в системе π-связей (+*M*-эффект).

Таким образом, очевидно, что введение заместителя в различные положения нуклеиновых оснований заметно меняет их кислотно-основные свойства. Систематическое изучение влияния заместителей на величину рK_a могло бы оказаться немаловажным для понимания химических особенностей и биологической роли различных гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, в том числе редких компонентов.

С этой точки зрения интересно выяснить, существует ли корреляция в действии одного и того же заместителя на различные основания, т. е. соблюдается ли в данном случае известное в теоретической органической химии правило линейной зависимости свободных энергий [112–114] (для гетероциклических соединений, см. обзор Жаффе [115]). Оказывается, что наблюдается довольно хорошая линейная зависимость между рK'_a производных урацила и рK'_a производных цитозина (рис. 3.12, табл. 3.15). Это означает, что в случае оснований нуклеиновых кислот вполне применимы такие корреляции и можно думать, что их использование окажется полезным при изучении механизмов химических и, возможно, ферментативных превращений нуклеиновых кислот.

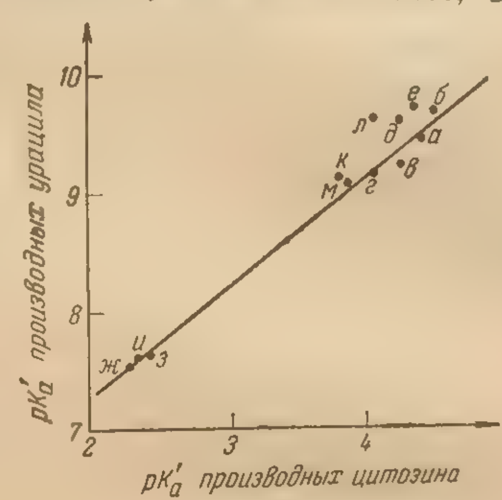


Рис. 3.12. Корреляция значений рK'_a производных урацила и цитозина (обозначение точек — см. индексы в табл. 3.15).

Из общей линейной зависимости выпадают рK'_a соединений с 5-метильным заместителем. Можно полагать, что такой эффект — следствие пространственных препятствий сольватации ионов. При этом в случае цитозиновых производных должна понижаться стабильность катиона, и, следовательно, в соответствии с уравнениями (3) и (4) уменьшается значение рK'_a; в случае урацила уменьшение стабильности аниона должно приводить к увеличению значения рK'_a в соответствии с уравнениями (5) и (6), что полностью согласуется с наблюдаемой картиной (см. рис. 3.12).

Роль фосфатных групп в нуклеотидах. Заметное влияние на величину рK_a основания оказывают фосфатные группы в нуклеотидах. В табл. 3.16 приведены значения рK_a ионизации некоторых нуклеозидов и нуклеотидов [102].

Причиной наблюдаемого возрастания рK_a в ряду:

нуклеозид ⩽ нуклеозид-2',3'-циклофосфат < нуклеозид-2'- и -3'-фосфаты < нуклеозид-5'-фосфат

является, очевидно, взаимодействие ионизованного основания с фосфатной группой нуклеотида.

Таблица 3.15. **Корреляция pK'_a ряда производных урацила и цитозина**

Определения производились спектрофотометрическим методом в 0,025 *М* ацетатном буфере для производных цитозина и в 0,1 *М* глициновом буфере для производных урацила

Индекс обозначения на рис. 3.12	Заместитель в основании	pK'_a для ряда урацила	Литература	pK'_a для ряда цитозина	Литература
а	—	9,5	*100*	4,45	*100*
б	1-Метил-	9,75	*98*	4,55	*98*
в	1-(β-*D*-2'-Дезоксирибофуранозил)-	9,3	*100*	4,3	*100*
г	1-(β-*D*-Рибофуранозил)-	9,25	*100*	4,1	*100*
д	1-(β-*D*-Рибофуранозил)-5-метил	9,68	*116*	4,28	*108*
е	1-(β-*D*-2'-Дезоксирибофуранозил)-5-метил-	9,8	*98*	4,40	*109*
ж	1-(β-*D*-Рибофуранозил)-5-фтор-	7,57	*100*	2,26	*100*
з	1-(β-*D*-2'-Дезоксирибофуранозил)-5-фтор-	7,66	*100*	2,39	*100*
и	1-(β-*D*-Арабинофуранозил)-5-фтор-	7,63	*105*	2,33	*106*
к	1-(Пиранозил)-*	9,2	*98*	3,85	*98*
л	1-(Пиранозил)-5-метил-*	9,7	*98*	4,1	*98*
м	1-(β-*D*-2'-Дезокси-2'-фторрибофуранозил)-	9,14	*117*	3,9	*107*

* Использовались следующие пиранозильные производные: 1-(β-*D*-глюкопиранозил)-, 1-(β-*D*-галактопиранозил)-, 1-(β-*D*-арабинопиранозил)- и 1-(β-*D*-ксилопиранозил)-, для которых значения pK'_a одинаковы.

Исходя из конформационных форм рибозы и дезоксирибозы (см. гл. 2), можно заключить, что возможность такого взаимодействия особенно велика в случае нуклеозид-5'-фосфатов, фосфатные группы которых могут находиться в пространственной близости к циклу основания. Значительно менее тесного контакта с основанием следует ожидать для 2'- и 3'-фосфатных групп, которые находятся в *транс*-положении по отношению к основанию*. В случае производных цитозина, где при ионизации ядра образуются цвиттерионы, стабильность последних, таким образом, должна быть выше в случае 5'-фосфатов, что, очевидно, приводит к большему увеличению pK'_a по сравнению с нуклеозидом, чем в случае 2'- и 3'-фосфатов. При диссоциации производных ура-

* Бо́льшая степень взаимодействия 5'-фосфатных групп по сравнению с 2'- и 3'-фосфатными группами проявляется, в частности, во влиянии на величину химического сдвига протонов в спектрах ЯМР соответствующих нуклеотидов по сравнению с нуклеозидами (см., например, [92, 118]).

цила взаимодействие отрицательного заряда ионизованного основания и отрицательных зарядов фосфатной группы должно приводить к уменьшению стабильности ионизованной формы основания и к сдвигу равновесия в сторону нейтральной формы, т. е. pK'_a должно увеличиваться и в этом случае, что согласуется с экспериментальными данными (см. табл. 3.16).

Таблица 3.16. **Влияние фосфатной группы нуклеотида на константу ионизации основания**[102]

Определения производились спектрофотометрическим методом при 20° С и нулевой ионной силе

Производные	pK_a					
	рибонуклеозида	2′-фосфата	3′-фосфата	2′ (3′)-фосфата смеси	5′-фосфата	2′, 3′-циклофосфата
Цитозина	4,17	—	—	4,43	4,54	4,12
Аденина	3,52	3,81	3,70	—	3,88	—
Урацила	9,38	—	—	9,96	10,06	9,47
Тимина	9,93	—	—	—	10,47	—
Гуанина	9,42 *	9,87	9,84	—	10,00	—
Гипоксантина	9,02	—	—	—	9,62	—

* pK_a дезоксигуанозина 9,52; pK_a дезоксигуанозин-5′-фосфата 10,00.

Ионизация фосфатных групп в нуклеотидах. В мононуклеотидах (за исключением циклофосфатов) остатки фосфорной кислоты обладают свойствами двухосновных кислот и в соответствии с этим имеют две константы ионизации. При этом первая константа ионизации pK_a имеет значение ~ 1, тогда как вторая лежит в районе pK_a 6—7. Циклофосфаты представляют собой одноосновные кислоты с $pK_a \sim 1$. Природа основания оказывает незначительное влияние на величину вторичной константы ионизации фосфатных групп в нуклеозидфосфатах (табл. 3.17).

Таблица 3.17. **Значения pK_a вторичной ионизации нуклеозид-5′-моно-, -ди- и -трифосфатов**[122]

Определения проводились при 25°С с учетом поправки на ионную силу, но без учета статистической поправки

Производное	pK_a			Производное	pK_a		
	5′-монофосфат	5′-дифосфат	5′-трифосфат		5′-монофосфат	5′-дифосфат	5′-трифосфат
Аденозина	6,57	7,20	7,68	Цитидина	6,62	7,18	7,65
Гуанозина	6,66	7,19	7,65	Уридина	6,63	7,16	7,58
Инозина	6,66	7,18	7,68				

Дигидропиримидины. При насыщении двойной связи в пиримидиновом ядре наблюдается резкое увеличение (табл. 3.18) соответствующих значений pK_a', что в случае производных цитозина связано, возможно, с увеличением вклада других таутомерных

Таблица 3.18. **Значения pK_a' дигидропиримидиновых производных**

Соединение	pK_a'	Литература	Соединение	pK_a'	Литература
1-Метилурацил	9,75	*119*	Цитидин	4,1	*100*
1-Метил-5,6-дигидроурацил	~12	*119*	5,6-Дигидроцитидин	6,1	*120*
Цитозин	4,45	*100*	1-Метил-5,6-дигидроцитозин	6,62	*73*
5,6-Дигидроцитозин	6,3	*119*	6-Окси-5,6-дигидроцитидин	5,56	*121*

форм в таутомерное равновесие, тогда как в случае производных урацила основную роль, по-видимому, играют условия делокализации отрицательного заряда в анионе, более благоприятные в урациле, чем в дигидроурациле.

Внешние факторы

Влияние ионной силы среды. Если в уравнения (4) и (6) (см. стр. 177) подставить выражения для коэффициентов активности, определяемые в соответствии с законом Дебая — Хюккеля (см., например,[123, 124]), то связь между кажущейся и термодинамической константами равновесия определится следующим уравнением:

$$pK_a' = pK_a^0 + \frac{0,5\sqrt{\mu}\,(2m-1)}{1+b\sqrt{\mu}} \qquad (9)$$

где μ — ионная сила раствора; m — заряд сопряженной кислоты; b — константа, зависящая, в частности, от эффективного радиуса иона в растворе.

Исходя из соотношения (9), следует ожидать, что при увеличении ионной силы среды соединения, диссоциирующие по уравнению (5) (стр. 177) и не обладающие в недиссоциированном виде зарядами — уридин, инозин, гуанозин — в щелочной области (но не их нуклеотиды), — будут уменьшать наблюдаемое значение pK_a. В то же время при диссоциации в кислой области цитидин, гуанозин, инозин, аденозин (но не их нуклеотиды), сопряженные кислоты которых обладают зарядом m, равным +1 [уравнение (3), стр. 177], при увеличении ионной силы должны увеличивать значения pK_a'. В первом приближении уравнением (9) можно воспользоваться для оценки эффекта ионной силы среды на нуклео-

тиды, определяя суммарный заряд молекулы сопряженной кислоты[102]. Исходя из подобных соображений, можно составить таблицу, качественно прогнозирующую изменение значений pK'_a с увеличением ионной силы среды (табл. 3.19)[102].

Таблица 3.19. **Предсказываемые уравнением (9) изменения pK'_a при увеличении ионной силы**

Соединение	Область pH, в которой определяется pK_a	Суммарный заряд m сопряженной кислоты	Изменения pK'_a при увеличении ионной силы среды $\Delta pK'_a$
Аденин, аденозин	2,0—7,0	+1	>0
Цитозин, цитидин	2,0—7,0	+1	>0
Фосфаты цитидина и гуанозина	2,0—7,0	0	<0
Урацил, уридин	7,0—12,0	0	<0
Тимин, тимидин	7,0—12,0	0	<0
Гуанозин	7,0—12,0	0	<0
Уридин-2', 3'-циклофосфат	7,0—12,0	−1	≪0
Уридин-, гуанозин- и инозинфосфаты	7,0—12,0	−2	≪0

Проведенные эксперименты полностью подтверждают эти выводы (табл. 3.20).

Следует отметить, что при повышении ионной силы среды константы ионизации нуклеотидов приближаются к константам ионизации нуклеозидов вследствие экранирования фосфатной группы. При достаточно малых значениях ионной силы, когда в уравнении (9) выражение $b\sqrt{\mu} \ll 1$, получаем:

$$pK'_a = pK^0_a + 0{,}5\sqrt{\mu}\,(2m - 1) \tag{10}$$

Уравнение (10) показывает, что при невысоких значениях ионной силы можно получить линейные зависимости pK'_a от $\sqrt{\mu}$ (см., например,[125]).

При исследованиях, связанных с изменением ионной силы среды, следует также учитывать влияние структуры и заряда катиона и аниона. Здесь можно отметить следующие закономерности[102]:

1. Двухвалентные ионы более эффективно уменьшают коэффициент активности оснований нуклеиновых кислот, чем одновалентные.

2. Более сильное влияние на величину pK_a оказывают ионы, имеющие меньший ионный радиус; одновалентные ионы по степени влияния располагаются в ряд:

$$Li^+ > Na^+ > K^+ > Cs^+$$

Таблица 3.20. **Экспериментально определенные значения pK_a для оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, полученные при разной ионной силе**[102]

Определения производились спектрофотометрическим методом 20°С

Соединение	pK'_a		$\Delta pK'_a$
	при $\mu = 0$	при $\mu = 1$	
Цитозин	4,68	4,78	+0,10
Цитидин	4,17	4,19	+0,02
Цитидин-3′ (2′)-фосфат	4,43	4,32	−0,11
Цитидин-5′-фосфат	4,54	4,43	−0,11
Цитидин-2′, 3′-циклофосфат	4,19	4,10	−0,09
Аденин	4,18	4,35	+0,17
Аденозин	3,52	3,70	+0,18
Аденозин-2′-фосфат	3,81	3,72	−0,09
Аденозин-3′-фосфат	3,70	3,68	−0,02
Аденозин-5′-фосфат	3,88	3,80	−0,08
2′-Дезоксиаденозин	—	3,79	—
2′-Дезоксиаденозин-5′-фосфат	—	3,79	—
Урацил	9,52	9,26	−0,26
Уридин	9,38	9,11	−0,27
Уридин-3′ (2′)-фосфат	9,96	9,12	−0,84
Уридин-5′-фосфат	10,96	9,24	−0,82
2′-Дезоксиуридин	9,50	9,22	−0,28
Тимин	10,00	9,74	−0,26
Тимидин-5′-фосфат	10,47	9,65	−0,82
Тимидин	9,93	9,65	−0,28
Уридин-2′, 3′-циклофосфат	9,47	8,95	−0,52
Гуанозин	9,42	9,22	−0,20
Гуанозин-2′-фосфат	9,87	9,20	−0,67
Гуанозин-3′-фосфат	9,84	9,19	−0,65
Гуанозин-5′-фосфат	10,00	9,33	−0,67
2′-Дезоксигуанозин	9,52	9,33	−0,19
2′-Дезоксигуанозин-5′-фосфат	10,00	9,33	−0,67
Инозин	9,02	8,81	−0,21
Инозин-5′-фосфат	9,62	8,92	−0,70

Влияние температуры. Одним из важнейших факторов, оказывающих влияние на константу равновесия вообще и, естественно, на константу кислотно-основного равновесия в частности, является температура. В табл. 3.21 показано изменение pK'_a для цитидина[126] и уридин-5′-фосфата[125] в кислой и щелочной средах при различной температуре. В обоих случаях наблюдается заметное уменьшение pK_a с повышением температуры. Это изменение константы ионизации описывается уравнением

$$pK_a = \frac{1}{2,3} \cdot \frac{\Delta F}{RT} = \frac{1}{2,3} \left(\frac{\Delta H}{RT} \cdot \frac{\Delta S}{R} \right) \qquad (11)$$

где ΔF, ΔH и ΔS — свободная энергия, энтальпия и энтропия реакции ионизации; T — абсолютная температура; R-универсальная газовая постоянная.

Таблица 3.21. **Изменение pK'_a цитидина и уридин-5′-фосфата с температурой**

Определения производились потенциометрически при ионной силе $\mu = 0{,}2$

Температура, °C	pK'_a цитидина [126]	pK'_a уридин-5′-фосфата [125]	Температура, °C	pK'_a цитидина [126]	pK'_a уридин-5′-фосфата [125]
20	4,32	9,34	40	4,15	9,01
30	4,22	9,18	50	4,06	8,85

В табл. 3.22 приведены определенные в настоящее время значения ΔF, ΔH и ΔS для некоторых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов.

Таблица 3.22. **Термодинамические параметры ионизации оснований нуклеозидов и нуклеотидов** [125, 127, 132]

Значения pK_a определялись спектрофотометрически при $\mu = 0{,}1$ и 25° C или потенциометрически при $\mu = 0{,}1$ и 20° C

Соединение	Диссоциация в кислой среде				Диссоциация в щелочной среде			
	pK_a	ΔF, ккал/моль	ΔH, ккал/моль	ΔS, кал/моль·град	pK_a	ΔF, ккал/моль	ΔH, ккал/моль	ΔS, кал/моль·град
Аденин	4,1	5,6	4,2	4,7	9,7	13,2	9,5	−12,4
	4,1	—	3,99	—	—	—	—	—
Аденозин	3,6	4,8	3,8	−3,4	—	—	—	—
	3,6	—	3,81	—	—	—	—	—
Дезоксиаденозин	3,8	—	3,87	—	11,8	16,1	11,0	−17,1
Цитозин	4,5	6,1	5,0	−3,7	—	—	—	—
	4,5	—	4,47	—	—	—	—	—
Цитидин	4,2	5,7	4,4	−5,0	—	—	—	—
Дезоксицитидин	4,3	—	4,3	—	9,4	12,8	10,1	−9,1
Гуанин	—	—	—	—	9,2	12,6	8,6	13,0
Гуанозин	1,6	2,2	1,00	−4,0	—	—	—	—
	1,6	—	0,99	—	—	—	—	—
Дезоксигуанозин	2,5	—	1,91	—	—	—	—	—
Дезоксигуанозин-5′-фосфат	2,9	—	0,14	—	8,8	12,0	7,2	−16,1
Гипоксантин	—	—	—	—	8,9	12,1	7,2	−16,1
Инозин	—	—	—	—	9,5	13,0	8,0	−1[illegible],8
Уридин	—	—	—	—	9,4	12,6	6,6	−19,1
Уридин-5′-фосфат	—	—	—	—				

Воздействие растворителя и концентрационный эффект. В настоящее время уже установлено, что пуриновые основания, нуклеозиды и нуклеотиды образуют в растворе ассоциаты, концентрация которых в соответствии с законом действующих масс растет с увеличением концентрации компонентов (см. гл. 4). Можно

ожидать, что с увеличением концентрации компонентов в растворе будут меняться их константы диссоциации. Действительно, в случае гуанозина такая зависимость была обнаружена[131], причем, как видно из рис. 3.13, с увеличением концентрации нуклеозида значение его pK'_a уменьшается. Это может служить объяснением различных значений получаемых при определении pK'_a спектрофотометрически (когда концентрация соединения колеблется в интервале 10^{-4}—10^{-5} *моль/л*) или потенциометрическим методом (при котором используются значительно более высокие концентрации веществ, что может приводить к ассоциации). Там, где это возможно, предпочтительным кажется применение спектрофотометрического метода *.

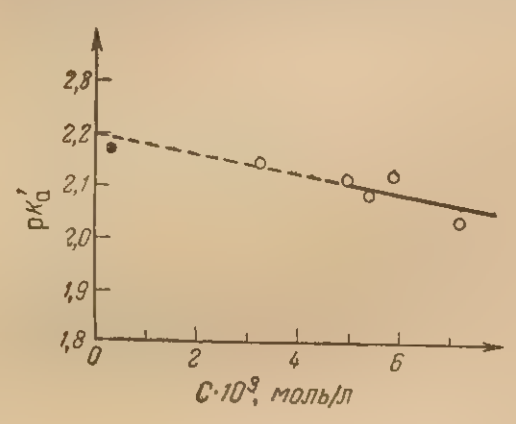


Рис. 3.13. Зависимость pK'_a гуанозина от его концентрации в растворе[131]:

жирными точками показаны результаты спектрофотометрических определений, кружочками — данные потенциометрических определений; 25° С, $\mu = 0{,}1$.

Очень важным фактором, влияющим на величину константы кислотно-основного равновесия, является природа растворителя. Выше мы уже рассматривали влияние ионной силы на равновесия, следует, кроме того, указать, что растворенные вещества и неионного характера также могут приводить к изменению константы равновесия. Механизм этого влияния может быть либо неспецифическим, как, например, изменение степени сольватации, разное для различных форм, участвующих в равновесии, либо специфическим, включающим образование химических связей между молекулами растворенного вещества и растворителя. Сооб-

---

* Следует отметить, что при определении термодинамических констант ионизации гуанозина так же, как и в значении его pK'_a, наблюдается несоответствие данных разных авторов. Так, Б. И. Сухоруков[127] приводит для гуанозина pK'_a 1,6 [спектральный метод определения, значения свободной энергии, теплоты и энтропии ионизации, равные 2,2 *ккал/моль*, 1 *ккал/моль* и 4 *кал/(моль·град)* соответственно]. Такая же величина pK'_a гуанозина дана в обзорах[128, 129] и найдена с помощью потенциометрического метода[130]. В то же время в ряде работ (см., например,[131]) pK'_a гуанозина спектрофотометрически было найдено равным 2,2. В соответствии с этим величины свободной энергии, теплоты и энтропии ионизации равны 2,62 *ккал/моль*, 2,22 *ккал/моль* и 2,5 *кал/(моль·град)* соответственно. Бунвилл и Швальб объясняют отличие своих данных[131] от результатов, полученных потенциометрически[130], концентрационными эффектами. Разница между результатами, получаемыми одним и тем же методом разными авторами, совершенно необъяснима.

щается[133], что в 48%-ном растворе сахарозы pK'_a гуаниловой кислоты несколько понижено; это, по-видимому, следует отнести за счет неспецифических эффектов. Однако в 8 *М* растворе мочевины величина pK'_a значительно выше (по сравнению с водными растворами) для всех четырех основных нуклеотидов. Различие в величине pK'_a составляет в кислой области для цитидиловой кислоты 0,47 единицы и для адениловой кислоты 0,5 единицы; в щелочной области для гуаниловой кислоты 0,58 единицы и для уридиловой кислоты 0,53 единицы[133]. Величина сдвига линейно возрастает с увеличением концентрации мочевины; в УФ-спектрах появляются заметные изменения, что может быть вызвано образованием водородных связей между основаниями и мочевиной.

От способности оснований, нуклеозидов и нуклеотидов к ионизации зависят многочисленные физические и химические свойства этих соединений, в частности их реакционная способность, а также такие важные показатели, как спектральные, хроматографические или электрофоретические характеристики. Во всех этих случаях обычно бывает необходимо знать относительное содержание ионизованной формы в растворе соединения, которое при каждом данном значении pH может быть определено по формулам:

$$\frac{C_i}{C_0} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK'_a}} \quad \text{ионизация по уравнению (3)}$$

$$\frac{C_i}{C_0} = \frac{1}{1 + 10^{pK'_a - pH}} \quad \text{ионизация по уравнению (5)}$$

где C_i — концентрация ионизованной формы; C_0 — общая концентрация исследуемого вещества.

Отношение C_i/C_0 иногда называют величиной заряда молекулы и широко используют для предварительной оценки хроматографической или электрофоретической подвижности вещества. Естественно, что и при ионообменной хроматографии, и при электрофорезе для максимального разделения различных мономеров необходимо использовать такие значения pH, при которых различие зарядов на молекулах максимально. Знание значений pK_a в условиях эксперимента может существенно облегчить задачу подбора оптимальных условий разделения.

VI. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Данные об электронных характеристиках, таутомерии и кислотно-основных свойствах позволяют a priori предсказать некоторые наиболее общие положения, связанные с реакционной способностью оснований нуклеиновых кислот. Естественно ожидать,

что различные таутомерные формы должны обладать разной реакционной способностью. Однако, к сожалению, экспериментально очень трудно определить, какая из форм в действительности принимает участие в исследуемой реакции, поскольку равновесие между таутомерными формами устанавливается очень быстро. Различной реакционной способностью должны обладать также нейтральные и ионная формы оснований; в данном случае экспериментально значительно легче сделать заключение о том, какая из них принимает участие в реакции. Следует ожидать, что катионные и нейтральные (но не анионные) формы оснований наиболее легко должны реагировать с нуклеофильными агентами, тогда как анионные и нейтральные формы (но не катионные) — с электрофильными.

Как уже отмечалось, в настоящее время в подавляющем большинстве случаев мы не знаем, какая из таутомерных форм принимает участие в той или иной реакции, и в дальнейшем изложении все рассуждения будут основываться на предположении, что реагирует главная (при данных условиях) таутомерная форма, хотя, вообще говоря, это вовсе не обязательно. Такое предположение (об участии одной главной формы) до некоторой степени оправдывается, поскольку многие предсказания, сделанные на его основе, согласуются с экспериментальными данными.

При теоретическом обсуждении реакционной способности мы будем оперировать с нейтральными формами оснований, допуская, что относительное распределение электронной плотности молекулы хотя и меняется при ионизации, но качественно остается близким к распределению к нейтральной молекуле. Такое допущение также экспериментально подтверждается: при участии в реакции заряженных молекул направление реакции правильно предсказывается на основании рассмотрения нейтральных молекул. Существует ряд подходов, позволяющих оценивать относительную реакционную способность различных атомов (групп) в одной молекуле или одинаковых атомов (групп) в различных молекулах. Часть этих подходов основана на квантовохимических расчетах; другая часть — на эмпирически найденных закономерностях и корреляциях. В химии нуклеиновых кислот пока больше используются подходы первого типа. Это удобно с той точки зрения, что можно делать предсказания без предварительных экспериментов, связанных с данными соединениями или с их ближайшими аналогами, используя часто закономерности, полученные для совершенно других классов соединений. Подход с использованием корреляционных уравнений требует исследования ближайших аналогов данного соединения для предсказания какого-то интересующего экспериментатора свойства. Однако аналоги оснований, нуклеозидов и нуклеотидов довольно трудно доступны, и этот метод, очень широко распростра-

ненный в органической химии, получил относительно малое применение в химии нуклеиновых оснований. Рассмотрим оба указанных подхода.

1. Использование квантовохимических расчетов

Большинство реакций оснований нуклеиновых кислот протекает без разрушения их циклической структуры, и поэтому часто при изучении различных реакций достаточно рассматривать только те свойства молекул, которые определяются распределением в них π-электронов. Больше того, такое приближение оказывается зачастую достаточным даже в тех случаях, когда происходит разрыв σ-связей. Поэтому в дальнейшем мы рассматриваем проблему реакционной способности в основном только с точки зрения свойств ее π-электронных орбиталей.

Существуют два подхода при предсказании химических свойств молекулы [134—136], первый из которых рассматривает характеристики изолированной молекулы, второй — учитывает изменения, происходящие в молекуле при взаимодействии с реагентом. Первый подход известен под названием «приближение изолированной молекулы», второй — под названием «приближение реагирующей молекулы».

Метод «приближения изолированной молекулы». В начале этой главы был рассмотрен ряд квантовохимических характеристик оснований нуклеиновых кислот: электронные плотности на атомах, порядки связей, энергии заполненных и свободных электронных уровней. Все эти характеристики могут быть использованы для предсказания реакционной способности молекулы, причем наиболее обычным для органической химии является использование электронных плотностей на атомах как меры их реактивности. Считается, что при реакциях с электрофильными реагентами наиболее реакционноспособным является атом с наибольшей электронной плотностью, тогда как при реакциях с нуклеофильными реагентами — с наименьшей. С этой точки зрения данные расчетов, представленные на молекулярных диаграммах (см. стр. 151—155), предсказывают, что атаке нуклеофильными реагентами в пиримидинах должны подвергаться атомы С-2, С-4 и С-6, несущие частичный положительный заряд, в пуринах — соответственно атомы С-2, С-4, С-6 и С-8. Электрофильной же атаке должны подвергаться атомы С-5 в пиримидинах, атомы кислорода карбонильных групп и атомы азота пиридинового типа, т. е. атомы, несущие частичный отрицательный заряд. Как будет показано ниже, эти выводы в основном подтверждаются экспериментальными данными и, таким образом, простейшее приближение оправдывает себя в смысле качественного предсказания реакционной способности атомов оснований нуклеиновых кислот.

Другая характеристика реакционной способности — порядок связи. Принято считать, что чем больше порядок связи, тем легче должно происходить электрофильное присоединение к этой связи. Из молекулярных диаграмм (см. стр. 151 сл.) следует, что в пиримидинах двойная связь С-5—С-6 имеет значительно более высокий порядок, чем связь С-4—С-5 в пуринах. Тогда в первом случае

NH_2 0,178 N 0,351 0,497 0,203 N O H
цитозин

O H_3C 0,255 0,496 NH 0,536 0,245 N O H
тимин

O 0,256 0,500 NH 0,513 0,250 N O H
урацил

NH_2 0,082 N N 0,148 0,479 0,183 0,430 N N H
аденин

O 0,217 N 0,209 NH 0,491 0,207 0,240 N N NH_2 H
гуанин

Рис. 3.14. Индексы свободной валентности атомов углерода оснований нуклеиновых кислот.

реакции присоединения должны протекать значительно легче — вывод, согласующийся с экспериментом (хотя, возможно, определенную роль здесь играют также и другие факторы).

Реакционную способность молекул в радикальных реакциях принято характеризовать индексом свободной валентности. Расчетные индексы свободной валентности углеродных атомов оснований нуклеиновых кислот приведены на рис. 3.14. Общий вывод, даваемый всеми методами расчета, заключается в следующем: в пиримидиновых основаниях наиболее реакционноспособной по отношению к гомолитическим реагентам является двойная связь С-5—С-6. К сожалению, отсутствие тщательных исследований по радикальным реакциям в ряду нуклеиновых оснований и их компонентов не дает возможности в настоящее время заключить, так

ли это на самом деле. Понятие «индекс свободной валентности» применяется также для характеристики нуклеофильных и электрофильных реакций, причем общее положение остается тем же, что и для радикальных процессов: реакция идет тем легче, чем выше индекс свободной валентности. Исходя из этого, можно сделать вывод, что двойная связь С-5—С-6 в пиримидинах представляет собой наиболее реакционноспособное место и что урацил более активен, чем цитозин. Эти выводы, в общем, согласуются с экспериментом, хотя имеются и определенные исключения. Так, например, и индекс свободной валентности, и заряды на атомах предсказывают, что атомы С-2 и С-4 в молекуле урацила должны быть примерно одинаковыми по своей реакционной способности и что в молекуле цитозина атом С-2 должен быть значительно более активен по отношению к нуклеофильным реагентам, чем С-4. Однако в обоих случаях в основаниях и в производных от них нуклеозидах и нуклеотидах более реакционноспособным является атом С-4 пиримидинового ядра.

При предсказании реакционной способности используются также энергетические характеристики молекулы. В добавление к сказанному ранее (см. стр. 159) здесь следует дать два общих положения, связанные с энергией высшего занятого и низшего свободного электронных уровней[136]:

1. Реакция данного соединения с электрофильным реагентом возможна, если энергия высшего занятого уровня для этого соединения выше энергии низшего свободного уровня реагента.

2. Реакция данного соединения с нуклеофильным реагентом возможна, если энергия низшего свободного уровня соединения ниже энергии высшего занятого уровня реагента.

Отсюда следуют два следующих вывода:

1. При прочих равных условиях к электрофильным реакциям более склонно соединение с более высоким высшим занятым уровнем.

2. К реакциям с нуклеофильными реагентами более склонны соединения с более низко расположенным низшим свободным уровнем.

Исходя из этого, следует признать из пуринов более склонным к электрофильным реакциям гуанин, что подтверждается всеми расчетными методами, а из пиримидинов — цитозин, если считать, что наиболее достоверные результаты дают усовершенствованные методы расчета. Эти выводы согласуются с экспериментом. В частности, например, известно, что при действии галоидов на пуриновые нуклеозиды и нуклеотиды производные гуанина реагируют очень легко, тогда как соответствующие производные аденина реагируют только в довольно жестких условиях (см. гл. 5). К сожалению, большие различия в результатах, касающихся расчета энергий низших свободных орбиталей (см. стр. 161), не дают возможности

сделать определенных выводов относительно склонности оснований к нуклеофильным реакциям.

Предсказания, сделанные на основании метода «изолированной молекулы», справедливы в том случае, когда строение реакционного комплекса близко к строению исходной молекулы. В тех же случаях, когда в реакционном комплексе исходная молекула подвергается сильным изменениям, необходимо учитывать эти изменения, что в какой-то степени позволяют сделать метод «приближения реагирующей молекулы».

sp^2 гибридизация

sp^3 гибридизация

I II III

R—атом водорода или различные радикалы

Рис. 3.15. Иллюстрация расчета энергии локализации на примере производного аденина:

I — исходная молекула с энергией π-электронов, равной E_0; *II* — реакционный комплекс Уэланда с суммарной энергией π-электронов в сопряженной системе *III* и электронов на локализованном атоме, равной E_1; *III* — сопряженная система электронов в реакционном комплексе.

Энергия локализации $E_л = E_0 - E_1$ различна в зависимости от того, сколько электронов помещается на рассчитываемые энергетические уровни.

Метод «приближения реагирующей молекулы». Один из наиболее распространенных квантовохимических подходов, рассматривающих реагирующую молекулу, основан на представлении о реакционном комплексе Уэланда, в котором электронная структура атома, подвергающегося атаке, соответствует sp^3-гибридизации и его орбитали выключаются из сопряжения. Энергия, необходимая для выведения данного атома из сопряжения, называется энергией локализации и представляет собой разность энергий π-электронов исходной структуры и структуры с выключенным из сопряжения атомом (рис. 3.15). В зависимости от типа реакции на энергетические уровни, рассчитываемые для сопряженной части структуры, помещается число электронов, равное числу электронов в исходной молекуле (нуклеофильные реакции), число электронов, меньшее на 2 по сравнению с исходной молекулой (электрофильные реакции), или число электронов, меньшее на 1 по сравнению с исходной молекулой (гомолитические реакции). При этом на локализованном атоме остается последовательно 0; 2 и 1 электрон. Соответствующие энергии локализации называются нуклеофильными, электрофильными и радикальными. Если реакция представ-

ляет собой реакцию присоединения по двойной связи, из сопряжения выключаются сразу два атома, принадлежащие этой связи.

Сопоставление энергии локализации с экспериментально определенными величинами свободной энергии активации ΔF, энтальпии активации ΔH (или с отличающейся от нее на RT энергией активации E) и энтропии активации ΔS приводит к выводу, что для данного класса реакций энергия локализации оказывается мерой относительной реакционной способности различных атомов в данной молекуле или одинаковых атомов в различных молекулах. При этом необходимо, чтобы, во-первых, для всех подобных реакций в процессе образования активированного комплекса энергии изменения σ-связей в молекуле были одинаковыми и, во-вторых, чтобы энтропии активации были постоянны или пропорциональны изменениям энергии π-связей. В настоящее время доступно довольно мало расчетных данных, относящихся к энергиям локализации.

В монографии Пюльманов приводятся [134], в частности, данные расчетов энергии локализации атомов С-2, С-6 и С-8 пурина и мочевой кислоты. При этом оказывается, что для обоих соединений порядок изменения энергий локализации при переходе от атома к атому одинаков. Мы приводим здесь взятую из этой книги таблицу с расчетами, выполненными для пурина (табл. 3.23).

Таблица 3.23. **Величины энергии локализации $E_л$ для атомов углерода в пурине**

Скелетный атом	$E_л$ в единицах β		
	нуклеофильные реакции	электрофильные реакции	радикальные реакции
С-2	2,32	2,57	2,45
С-6	2,18	2,48	2,33
С-8	2,18	2,39	2,29

Исходя из этих данных, можно полагать, что в пурине по отношению и к нуклеофильным, и к электрофильным, и к гомолитическим реакциям наиболее реакционноспособным должен быть атом С-8. Отличие мочевой кислоты (по данной картине) заключается в том, что расчеты предсказывают для нее бо́льшую реакционную способность в нуклеофильных реакциях атома С-6.

Если перенести эти данные на другие пурины, то можно предсказать значительную реакционную способность атома С-8 в различного рода реакциях, причем для электрофильных реакций более высокую, чем у С-2 и С-6; для нуклеофильных реакций возможно несколько более низкую, чем у С-6, но значительно более

высокую по сравнению с С-2. Этот вывод полностью согласуется с известными экспериментальными данными, в частности с легкостью обмена протона при С-8 пуринов на дейтерий и тритий и с отсутствием обмена протона, связанного с атомом С-2 (см. стр. 326). Выше уже упоминалось, что галоидирование пуринов происходит с замещением водорода при С-8. Это превращение является примером электрофильных реакций.

К сожалению, известно довольно мало примеров нуклеофильных реакций с участием пуринов, так что здесь трудно сопоставить выводы теории с экспериментом. Были рассчитаны значения энергии локализации нуклеофильного присоединения по двойной связи и замещения аминогруппы в цитидине и его 5-метилпроизводном [137] и получено удовлетворительное согласие расчетных данных с относительными скоростями реакций этих соединений с гидроксиламином. Сопоставление энергий локализации присоединения по двойной связи в урациле и цитозине также хорошо согласуется с относительной реакционной способностью этих соединений (см. гл. 5). Меньшая величина энергии локализации присоединения по двойной связи в урациле (по сравнению с цитозином) согласуется также с известным фактом большей стабильности фотогидрата уридина [1-(β-*D*-рибофуранозил)-6-окси-5,6-дигидроурацила] по сравнению с фотогидратом цитидина [1-(β-*D*-рибофуранозил)-6-окси-5,6-дигидроцитозином] (см. гл. 12).

Подводя итоги, можно указать следующие общие принципы определения наиболее реакционноспособных мест в молекулах на основе квантовомеханических расчетов.

1. По отношению к электрофильным реакциям наиболее активны атомы с наименьшей электрофильной энергией локализации, наибольшей электронной плотностью и наибольшим индексом свободной валентности. Такими атомами являются: С-8 в пуринах (по энергии локализации и индексу свободной валентности) и С-5 в пиримидинах (по индексу свободной валентности и по электронной плотности).

2. По отношению к нуклеофильным реакциям наиболее реакционноспособны атомы с минимальной нуклеофильной энергией локализации, наибольшим индексом свободной валентности и наименьшей электронной плотностью. Такими атомами являются: в пиримидинах С-6 (по электронной плотности и индексу свободной валентности), С-2 и С-4 (по электронной плотности); в пуринах С-8 (по энергии локализации и индексу свободной валентности) и С-6 (по энергии локализации и электронной плотности).

3. По отношению к радикальным актам наиболее реакционноспособны атомы с наименьшей энергией радикальной локализации и наибольшим индексом свободной валентности, а именно: С-8 в пуринах (по обоим признакам), С-5 и С-6 в пиримидинах.

4. Что касается присоединения по двойной связи, то здесь наиболее активны соединения с минимальной энергией локализации двойной связи и максимальным ее порядком.

Ограниченность рассмотренных квантовохимических подходов состоит в том, что они не учитывают многих чрезвычайно важных факторов, зачастую определяющих и направление, и скорость реакции. Таковыми, например, являются влияние растворителя, пространственные эффекты заместителей и др. О пространственных эффектах заместителей мы уже говорили при рассмотрении кислотно-основных свойств оснований. Отметим еще несколько примеров подобного влияния. Из данных по конформации нуклеозидов и нуклеотидов (см. гл. 2) следует, в частности, что для этих соединений в обычных условиях предпочтительной является *анти*-конформация, при которой в пиримидиновых нуклеозидах и нуклеотидах остаток рибозы и карбонильная группа находятся по разные стороны от N-гликозидной связи. Если эта конформация сохраняет свое преимущество и в растворе, то можно ожидать, что остаток сахара будет пространственно затруднять нуклеофильное присоединение по двойной связи, вследствие чего реакции подобного рода с объемистыми реагентами могут стать даже невозможными. Не исключено, например, что такие реагенты, как семикарбазид или реактив Жирара (см. стр. 350), не присоединяются по двойной связи именно в силу пространственных затруднений. Более трудная фотохимическая гидратация двойной связи в уридин-5′-фосфате по сравнению с уридин-3′-фосфатом, возможно, также связана с пространственными эффектами (см. гл. 12). Несмотря на эти довольно многочисленные факты, детального исследования пространственного влияния остатка сахара на реакционную способность оснований до сих пор еще нет.

Заместители в положении 5 пиримидинового цикла также оказывают определенное пространственное влияние на протекание различных реакций. Выше указывалось их влияние на величину pK_a, здесь следует отметить затрудненность присоединения по двойной связи в нуклеофильных реакциях 5-замещенных пиримидинов (что, очевидно, связано с индуктивными и пространственными эффектами). Так, например, при реакции тимидина с производными гидразина или гидроксиламина в щелочной среде скорость модификации значительно ниже по сравнению с соответствующими реакциями для уридина (см. стр. 459 сл. и 467 сл.).

Еще одним фактором, который не учитывается квантохимическими расчетами, является возможность образования различного рода внутримолекулярных связей, например водородной связи остатка сахара с основанием (см. стр. 141). Естественно ожидать, что возникновение таких связей также должно влиять на реакционную способность, увеличивая ее (если в реакционном комплексе эти дополнительные связи становятся более прочными по

сравнению с исходной молекулой) или уменьшая (если для образования переходного комплекса необходим разрыв таких внутримолекулярных связей).

Наконец, на скорость и направление реакции оказывает влияние и растворитель. Он неспецифически сольватирует исходные молекулы и переходные комплексы или может образовывать с исходными молекулами и переходными комплексами специфические химические связи (например, водородные). Если сольватация или способность к образованию таких связей в переходном комплексе выражена сильнее, чем в исходных молекулах, то данный растворитель ускоряет реакцию; если же образование подобных связей в исходных молекулах энергетически более выгодно, чем в реакционном комплексе, то растворитель замедляет реакцию. Эти эффекты могут оказаться настолько сильными, что возможно даже изменение направления реакции; поэтому данные, полученные в одном растворителе, нельзя непосредственно переносить на другой растворитель. Кроме того, растворитель может конкурировать с реагентом в процессе реакции. Случаи, когда реакции в разных растворителях протекают в различных направлениях, известны. Например, при галоидировании пиримидиновых оснований в безводном растворителе происходит замещение водородного атома в положении 5 гетероцикла; в присутствии воды эта реакция идет по пути присоединения брома и оксигруппы по С-5 и С-6 двойной связи (подробнее см. стр. 330 сл.). Влияние всех этих факторов необходимо учитывать при попытках оценивать реакционную способность соединений.

Если сопоставить различные потенциально реакционные места в одной и той же молекуле, например в нуклеозиде, то можно видеть их неэквивалентность, хотя бы с точки зрения пространственного влияния остатка сахара. При *анти*-конфигурации нуклеозида атом С-8 в пуриновых производных должен быть в большей степени пространственно экранирован по сравнению с атомами С-2 и С-6. Соответственно, реакции по С-8 будут идти медленнее, чем можно было бы предполагать исходя из простого квантовохимического рассмотрения.

Можно ожидать, что даже для реакций с одними и теми же реагентами различные участки молекулы будут образовывать реакционные комплексы, отличающиеся по степени сольватированности, что также приведет к отклонению экспериментальных данных от теоретически предсказываемых. С этой точки зрения кажется более правильным применять квантовохимические расчеты для сравнения эквивалентных реакционных центров в разных молекулах, фиксируя таким образом до некоторой степени другие факторы, влияющие на реакционную способность. Именно подобным путем поступают в органической химии при изучении влияния

условий на скорость реакции, в частности при корреляциях реакционной способности с электронными характеристиками заместителей.

2. Применение корреляционных уравнений *

Детальное изучение химических особенностей самих оснований и их поведения в составе нуклеозидов и нуклеотидов требует определения места этих соединений в ряду ближайших аналогов, отличающихся друг от друга какой-либо монотонно меняющейся характеристикой, например наличием разных заместителей, обладающих различными индуктивными эффектами или различным пространственным эффектом. Так, изучая какую-нибудь определенную реакцию ряда 1-N-алкилзамещенных пиримидинов с разнообразными алкильными заместителями, можно было бы лучше оценить роль рибозного (или дезоксирибозного) остатка в определении химических свойств основания в составе нуклеозида или нуклеотида. Подобным подходом широко пользуются в органической химии для изучения механизмов реакций, причем оказывается, что свободная энергия активации многих реакций является линейной функцией некоторой характеристики, меняющейся от одного заместителя к другому, но постоянной для данного заместителя в разных соединениях. Данный принцип достаточно хорошо известен и формулируется как правило линейной зависимости свободных энергий. Хорошо известны частные случаи применения этого правила — уравнения Гамметта или уравнение Тафта. Они связывают реакционную способность ряда родственных соединений по отношению к одному и тому же реагенту с электронными характеристиками заместителей в этих соединениях соотношениями типа

$$\lg \frac{k_i}{k_0} = \rho\sigma_i$$

Здесь k_i — константа скорости реакции соединения с заместителем i; k_0 — константа скорости реакции с некоторым заместителем, выбранным в качестве стандартного; ρ — коэффициент пропорциональности, характерный для данной реакции; σ_i — характеристика электронных свойств заместителя, постоянная для данного заместителя в различных соединениях и реакциях **.

Зависимости подобного типа достаточно универсальны, и корреляции с величинами σ существуют не только для значений свободной энергии реакций, но и для разнообразных характеристик

---

* Обзоры — см. [112–114].

** В ряде случаев один и тот же заместитель может характеризоваться несколькими значениями σ, например, в зависимости от того, участвует ли он в сопряжении или нет и т. д.

соединения, например для частот в ИК-спектрах, величин химических сдвигов в спектрах ЯМР и т. д.

Примеры применения такого рода корреляций, хотя пока и немногочисленные, существуют и в ряду производных оснований нуклеиновых кислот, показывая принципиальную применимость правила линейной зависимости свободных энергий и для этого

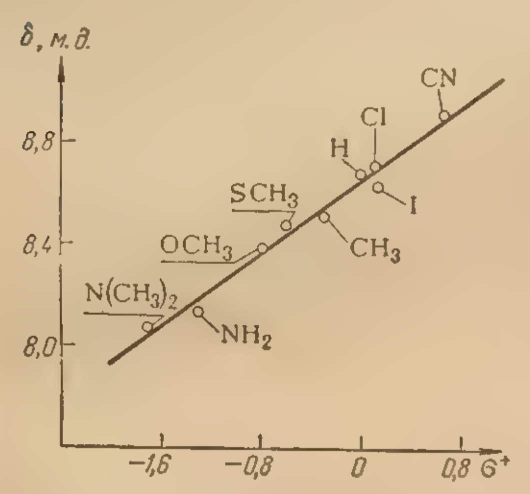


Рис. 3.16. Зависимость химического сдвига протона при С-8 6-замещенных пуринов от σ^+-констант заместителей [139].

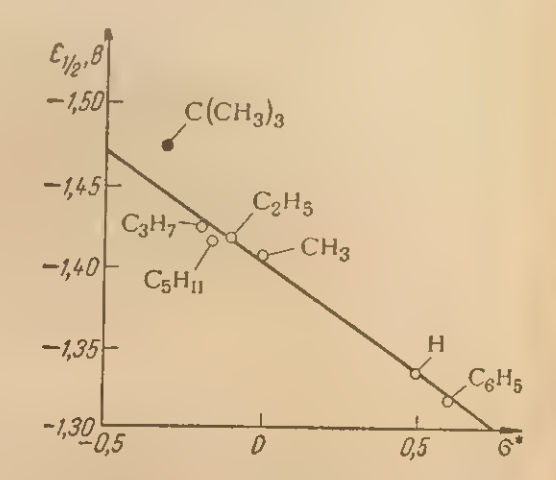


Рис. 3.17. Зависимость потенциала полуволны полярографического восстановления (относительно насыщенного каломельного электрода) 5-замещенных 6-азаурацилов от σ^*-констант 5-заместителя (в водном растворе при pH 8,3) [140].

класса соединений. Выше (см. стр. 187) мы уже рассматривали корреляцию pK_a в ряду урацила и цитозина. Существование такой корреляции означает, что в обоих этих случаях один и тот же заместитель может быть охарактеризован определенной, постоянной для данного заместителя величиной; это и является одной из формулировок правила линейной зависимости свободных энергий.

Более того, известны случаи, когда проводились корреляции непосредственно с одной или одновременно с несколькими σ-постоянными. В работах Кобурна и др. [138, 139] получена хорошая линейная зависимость (рис. 3.16) величины химического сдвига сигналов протонов при С-2 и С-8 в спектре ЯМР 6-замещенных пуринов от константы Брауна [114] заместителя в положении 6. Аналогичная картина получена и для зависимости величины химического сдвига протона при С-8 от суммы величин σ^+ для заместителей, находящихся в положениях 2 и 6 в ряду 2,6-дизамещенных пуринов [139]. Эти же авторы попытались провести корреляцию химических сдвигов протонов и с другим набором σ-постоянных, а именно с индуктивной σ_I и резонансной σ_R константами Тафта [138, 139]. При

этом для 6-замещенных пуринов были получены следующие уравнения:

$$\Delta\delta = 0{,}4\sigma_I + 0{,}7\sigma_R \qquad \text{(для протона при С-8)}$$

$$\Delta\delta = 0\sigma_I + 0{,}9\sigma_R \qquad \text{(для протона при С-2)}$$

где $\Delta\delta$ — представляет собой разность химических сдвигов соответствующего протона в замещенном и незамещенном пуринах.

Как следует из этих уравнений, химический сдвиг протона при С-2 определяется только мезомерными эффектами, тогда как химический сдвиг протона при С-8 определяется и мезомерными, и индуктивными эффектами (см. стр. 186). Рассмотрение мезомерных формул приводит к выводу, что между положениями 2 и 6 в 6-замещенном пурине должно иметься лишь незначительное мезомерное взаимодействие (мета-расположение). Наблюдаемая зависимость может означать, что химический сдвиг определяется в основном электронной плотностью на соседних атомах азота, один из которых находится в орто-, а другой в пара-положении к 6-заместителю. В случае химического сдвига протона при С-8 полученная зависимость не неожиданна, поскольку атом С-8 может взаимодействовать с 6-заместителем и по индуктивному, и по мезомерному механизмам. Из этого примера видно, что такого рода анализ может дать очень много сведений о тонкой структуре электронного влияния заместителей на свойства молекул.

Другим примером [140] является применение констант Тафта для коррелирования зависимости потенциала полуволны полярографического восстановления на ртутном капельном электроде 5-замещенных 6-азаурацилов от σ-константы заместителя. Полученная линейная зависимость для ряда заместителей (рис. 3.17) показывает общность механизма восстановления соответствующих соединений и зависимость его от полярных эффектов заместителей. Выпадение из общей зависимости величины потенциала полуволны восстановления в случае 5-*трет*-бутилпроизводного означает, вероятно, что для достаточно объемистых заместителей заметную роль начинает играть пространственный эффект. Отрицательный наклон прямой является совершенно естественным: значит, с увеличением электроотрицательности заместителя восстановление (т. е. процесс передачи данному соединению электрона) облегчается.

Таким образом, принципиальных ограничений для применения правила линейной зависимости свободных энергий при исследовании свойств производных оснований нуклеиновых кислот не существует. Использование подобных закономерностей может дать много ценной информации о свойствах компонентов нуклеиновых кислот.

Влияние ионизации на реакционную способность оснований. Выше уже отмечалось, что многие реакции в ряду исследуемых соединений идут с участием протонированных или депротонированных оснований. В тех случаях, когда электрофильный или

нуклеофильный реагент сам не способен к ионизации и реакция представляет собой простую одностадийную необратимую реакцию, можно ожидать простых зависимостей скорости реакции от концентрации водородных ионов. В случае нуклеофильной реакции непротонирующегося в данных условиях нуклеофильного агента с протонирующейся молекулой основания наблюдаемая константа скорости определяется следующим соотношением:

$$k_{набл} = k_0 \frac{[H^+]}{K_a' + [H^+]} \qquad (12)$$

где $k_{набл}$ — наблюдаемая константа скорости; k_0 — истинная константа скорости реакции катиона с нуклеофильным агентом, K_a' — кажущаяся константа ионизации основания по уравнению (3); $[H^+]$ — концентрация водородных ионов.

Зависимостей такого рода можно ожидать при различных гидролитических превращениях оснований нуклеиновых кислот. В качестве примера можно привести дезаминирование дигидроцитозиновых производных (см. гл. 5).

Зависимость скорости дезаминирования фотогидрата цитидина (6-окси-5,6-дигидроцитидина) [121] от величины pH характеризуется монотонным возрастанием величины наблюдаемой константы скорости при уменьшении pH. Это же следует и из уравнения (12). Анализ показывает, однако, что значительную роль в процессе дезаминирования играет также нейтральная форма основания (в составе нуклеозида). Поэтому при достаточно высоких значениях pH константа скорости не равна нулю, как можно было бы ожидать, если бы реагировала только протонированная форма, и имеет определенное, не зависящее от pH значение.

В том случае, когда происходит электрофильная реакция с анионом, образующимся при диссоциации нейтральной молекулы типа уридина или гуанозина и когда сам электрофильный агент не способен к депротонизации, зависимость наблюдаемой константы скорости реакции от концентрации водородных ионов может быть представлена в виде

$$k_{набл} = k_0 \frac{K_a'}{[H^+] + K_a'} \qquad (13)$$

где k_0 — истинная константа скорости реакции аниона с электрофильным агентом; K_a' — кажущаяся константа ионизации основания по уравнению (5).

Реакциями такого типа, по-видимому, являются некоторые реакции алкилирования, например взаимодействие гуанозина, уридина, инозина и псевдоуридина с акрилонитрилом (подробнее см. гл. 5). В случае реакции акрилонитрила с уридином изучение зависимости скорости реакции от pH показывает, что величины k_0,

вычисленные по формуле (15) исходя из экспериментальных значений $k_{набл}$, сохраняют в пределах ошибки опыта постоянные значения [141]:

pH	$k_{набл}$, *мин*$^{-1}$	k_0, *мин*$^{-1}$
9,15	4,57	17,5
9 70	8,97	16,1
10,05	15,40	20,9

Постоянство k_0 подтверждает справедливость принятого механизма для реакции электрофильного агента с анионом.

Однако указанные простейшие случаи, когда ионизуется лишь одно из реагирующих веществ, в реакциях оснований нуклеиновых кислот встречаются довольно редко. Значительно чаще приходится иметь дело с процессами, в которых к ионизации способны оба реагирующих соединения. Здесь целесообразно рассмотреть несколько наиболее часто встречающихся типов превращений.

1. Реакции катионной формы основания со способным к протонированию нуклеофильным реагентом. К реакциям этого типа относится большинство нуклеофильных реакций цитидина, аденозина и гуанозина. Если реакция представляет собой одностадийный процесс взаимодействия катиона с нуклеофильным агентом, величина наблюдаемой константы скорости реакции определяется следующим уравнением:

$$k_{набл} = k_0 \frac{(K'_a)_N \cdot [H^+]}{\{(K'_a)_{осн} + [H^+]\} \cdot \{(K'_a)_N + [H^+]\}} \qquad (14)$$

где k_0 — истинная константа скорости реакции катиона основания с нуклеофильным реагентом; $[H^+]$ — концентрация водородных ионов; $(K'_a)_{осн}$ и $(K'_a)_N$ — константы протонирования основания и нуклеофильного реагента по уравнениям (3) и (7).

Анализ этого выражения позволяет сделать вывод, что зависимость наблюдаемой константы скорости от pH имеет максимум при значении

$$pH = \frac{(pK'_a)_{осн} + (pK'_a)_N}{2}$$

и что при pH, равном $(pK'_a)_{осн}$ и $(pK'_a)_N$, наблюдаемые константы скорости равны. В качестве примера такого рода превращений можно привести реакцию замещения аминогруппы в цитидине на семикарбазидную группу [142] (см. также стр. 350).

2. Совершенно аналогичное уравнение получается и для зависимости $k_{набл}$ от концентрации водородных ионов при реакции нейтральной формы способного к потере протона основания с анионным нуклеофильным агентом. В этом случае в формуле (14) $(K'_a)_{осн}$ и $(K'_a)_N$ — константы ионизации основания и нуклеофильного

реагента по уравнению (5), величина которых определяется выражением (8).

3. Уравнение этого же типа описывает зависимость наблюдаемой константы скорости от концентрации водородных ионов в случае, когда нейтральное основание, способное депротонироваться в соответствии с уравнением (5), реагирует с нейтральным нуклеофильным реагентом, способным протонироваться в соответствии с уравнением (3). В формуле (14) для этого случая $(K'_a)_N$ — константа ионизации нуклеофильного реагента по уравнению (3), определяемая выражением (7), и $(K'_a)_{осн}$ — константа ионизации основания по уравнению (5), определяемая выражением (8).

4. Для реакции нейтральной формы основания, способного протонироваться, с нейтральной формой способного протонироваться нуклеофильного реагента константа скорости $k_{набл}$ запишется формулой [обозначения те же, что в уравнении (14)]

$$k_{набл} = k_0 \frac{(K'_a)_{осн} \cdot (K'_a)_N}{\{(K'_a)_{осн} + [H^+]\} \cdot \{(K'_a)_N + [H^+]\}} \tag{15}$$

Реакции нейтральных оснований с нейтральными реагентами, хотя и идут медленнее, чем реакции ионизованных оснований с нейтральными реагентами, тем не менее часто искажают зависимости, приведенные выше. Кроме того, очень часто истинные механизмы протекающих реакций на самом деле значительно сложнее, чем простые одностадийные превращения. Поэтому хотя практически все реакции оснований нуклеиновых кислот проявляют зависимость от pH, тем не менее не всегда можно удовлетвориться приведенными выше простыми формулами и в каждом конкретном случае для понимания зависимости скорости реакции от кислотности среды необходимо детальное исследование механизмов превращений. В той мере, в какой это возможно в настоящее время, такой анализ для конкретных реакций приведен во второй половине данной книги.

Влияние на скорость реакции ионной силы. Во всех приведенных выше уравнениях зависимости наблюдаемой константы скорости реакции от концентрации водородных ионов фигурирует кажущаяся константа ионизации K'_a[143]. Как, уже отмечалось (см. стр. 190), эта константа зависит от ионной силы. Таким образом, следует ожидать зависимости величины константы скорости реакции от ионной силы в тех случаях, когда для реакции необходимо предварительное протонирование или депротонирование реагирующих веществ. Для реакции заряженного основания с заряженным реагентом зависимость скорости реакции от ионной силы связана не только с изменением констант ионизации соединений,

но и с более общим эффектом, который вытекает из постулата о том, что скорость любой реакции

$$A + B \rightleftarrows X_{акт} \longrightarrow C$$

пропорциональна концентрации активированного комплекса $X_{акт}$, находящегося в равновесии с исходными продуктами. Константа этого равновесия, как обычно, выражается отношением активностей компонентов, и концентрация $X_{акт}$ зависит от коэффициентов активности и, следовательно, от ионной силы.

Исследование влияния ионной силы на скорость реакции в каждом конкретном случае может дать значительную информацию о механизме реакции. К сожалению, эффекты, связанные с изменением ионной силы, в реакциях оснований нуклеиновых кислот и их производных практически не изучались.

Таким образом, в данной главе мы рассмотрели некоторые вопросы, связанные с реакционной способностью оснований самих по себе и в составе нуклеозидов и мононуклеотидов. Изложенные представления могут быть использованы при изучении превращений предшественников нуклеиновых кислот, нуклеотидных коферментов и подобных им соединений, где гетероциклическое основание не взаимодействует или слабо взаимодействует с другими основаниями или ненуклеотидными веществами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стрэйтвизер Э., Теория молекулярных орбит для химиков-органиков, Изд. «Мир», 1965, стр. 242.
2. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, Изд. «Мир», 1965, стр. 80.
3. Хигаси К., Баба Х., Рембаулг А., Квантовая органическая химия, Изд. «Мир», Москва, 1967, стр. 160.
4. Матье Ж., Алле А., Принципы органического синтеза, Издатинлит, 1962, стр. 38.
5. Hofman T. A., Ladic J., Adv. Chem. Phys., 7, 84 (1964).
6. Fernandez-Alonzo J. I., Adv. Chem. Phys., 7, 5 (1964).
7. Giessner-Prettre C., Pullman A., Theoret. chim. acta, 9, 279 (1968).
8. Kwiatkowski J. S., Theoret. chim acta, 10, 47 (1968).
9. Pullman A., Kochanski E., Gilbert M., Denis A., Theoret. chim. acta, 10, 231 (1968).
10. Куприевич В. А., Данилов В. И., Шрамко О. В., Теор. и экспер. хим., 2, 734 (1966).
11. Veillard A., Pullman B., J. Theoret. Biol., 4, 37 (1963).
12. Nagata C., Imamura A., Tagashira Y., Kodama M., Bull. Chem. Soc. Japan, 38, 1638 (1965).
13. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, Изд. «Мир», 1965, стр. 125.
14. Sundaralingam M., Jensen L. H., J. Mol. Biol., 13, 930 (1965).
15. Пюльман Б., Пюльман А., «Квантовая биохимия», Изд. «Мир», 1965, стр. 128.
16. Imamura A., Fujta H., Nagata C., Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 522 (1967).

17. Fraenkel G., Carter R. E., McLachlan A., Richards J. H., J. Am. Chem. Soc., 82, 5846 (1960).
18. Spieseche H., Schneider W. G., Tetrahedron Letters, 1961, 468.
19. Shaefer T., Schneider W. G., Canad. J. Chem., 41, 966 (1963).
20. MacLean C., Mackor E. L., Mol. Phys., 4, 241 (1961).
21. Pullman B., Tetrahedron Letters, 1963, 231.
22. Lykos P. G., Miller R. L., Tetrahedron Letters, 1963, 1743.
23. Veillard A., J. chim. phys., 59, 1056 (1962).
24. Veillard A., Pullman B., C. r., 253, 2418 (1961).
25. Schweizer M. P., Chan S. J., Helmkamp G. H., Ts'o P. O. P., J. Am. Chem. Soc., 86, 696 (1964).
26. Стрэйтвизер Э., Теория молекулярных орбит для химиков-органиков, Изд. «Мир», 1965, стр. 135.
27. Berthod H., Pullman A., J. chim. phys., 62, 942 (1965).
28. Delre J., J. Chem. Soc., 1958, 4031.
29. Smith C. P., Dielelctric Behaviour and structure, McGraw-Hill, N. Y., 1955.
30. DeVoe H., Tinico I. jr., J. Mol. Biol., 4, 500 (1962).
31. Berthod H., Giessner-Prettre G., Pullman A., Theoret, chim. acta, 5, 53 (1966).
32. Berthod H., Giessner-Prettre G., Pullman A., Theoret, chim. acta, 8, 212 (1967).
33. Стрэйтвизер Э., Теория молекулярных орбит для химиков-органиков, Изд. «Мир», 1965, стр. 225.
34. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, Изд. «Мир», 1965, стр. 102, 172.
35. Коулсон Ч., Валентность, Изд. «Мир», 1965, стр. 254.
36. Стрэйтвизер Э., Теория молекулярных орбит для химиков-органиков, Изд. «Мир», 1965, стр. 231.
37. Коулсон Ч., Валентность, Изд. «Мир», 1965, стр. 268.
38. Стрэйтвизер Э, Теория молекулярных орбит для химиков-органиков, Изд. «Мир», 1965, стр. 166.
39. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, Изд. «Мир», 1965, стр. 110 и 177.
40. Lifschitz C., Bergwan E. D., Pullman B., Tetrahedron Letters, 1967, 4583.
41. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 15, 261 (1968).
42. Janion C., Shugar D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 617 (1965).
43. Katritzky A. R., Lagowski J. M., in «Advances in Heterocyclic chemistry», v. 1, Acad. Press, N. Y.—L., 1963, p. 312.
44. Mason S. F., The Chemistry and Biology of Purines. A Ciba Foundation Symposium, London, 1957, p. 60.
45. Карапетьянц М. Х., Химическая термодинамика, Госхимиздат, 1953, стр. 46.
46. Данилов В. И., Биофизика, 12, 540 (1967).
47. Trueblood K. N., Horn P., Luzzati V., Acta cryst., 14, 965 (1961); Shefter E. Trueblood K. N., Acta cryst., 18, 1067, (1965).
48. Shugar D., Fox J. J., Biochim. Biophys. Acta, 9, 199 (1952).
49. Miles H. T., Biochim. Biophys. Acta, 22, 247 (1956).
50. Miles H. T., Biochim. Biophys. Acta, 27, 46 (1958).
51. Angell C. L., J. Chem. Soc., 1961, 504.
52. Сухоруков Б. И., Айказян В. Ц., Ершов Ю. А., Биофизика, 11, 753 (1966).
53. Kokko J. P., Goldstein J. H., Mandell L., J. Am. Chem. Soc., 83, 2909 (1961).
54. Katritzky A. R., Waring A. J., J. Chem. Soc., 1962, 1540.
55 Paul M. A., Long F. A., Chem. Rev., 57, 1 (1957).

56. Spencer M., Acta cryst., **12**, 59 (1959).
57. Brown D. J., Lyall J. M., Austr. J. Chem., **15**, 851 (1962).
58. Hebne C., Rivail J. L., C. r., **D264**, 861 (1967).
59. Ulbricht T. L. V., Tetrahedron Letters, **1963**, 1027.
60. Miles H. T., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1007 (1963).
61. Gatlin L., Davis J. C., J. Am. Chem. Soc., **84**, 4464 (1962).
62. Miles H. T., Bradley B. R., Becker E. D., Science, **142**, 1569 (1963).
63. Pitha J., Beranek J., Coll. Czech. Chem. Comm., **28**, 1507 (1963).
64. Ulbricht T. L. V., J. Chem. Soc., **1965**, 6131.
65. Pithova P., Piskala A., Pitha J., Sorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., **30**, 1626 (1965).
66. Kenner G. W., Reese C. B., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 855.
67. Wempen J., Duschinsky R., Kaplan L., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4755 (1961).
68. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1962**, 1348.
69. Helene C., Hang A., Delbrück M., Douzou P., C. r. **259**, 3385 (1964).
70. Helene C., Douzou P., C. r., **259**, 4853 (1964).
71. Brown D. M., Hewlins M. J. E., Schell P., J. Chem. Soc., C, **1968**, 1925.
72. Furberg S., Jensen L. H., J. Am. Chem. Soc., **90**, 470 (1968).
73. Brown D. M., Hewlins M. J. E., J. Chem. Soc., C, **1968**, 2050.
74. Dupuy-Mamelle N., Pullman B., J. chim. phys., **64**, 7[illegible] (1967).
75. Brown D. J., Mason S. F., J. Chem. Soc., **1957**, 682.
76. Miles H. T., Howard F. B., Frazier J., Science, **142**, 1458 (1963).
77. Howard F. B., Miles H. T., J. Biol. Chem., **240**, 801 (1965).
78. Miles H. T., Biochim. Biophys. Acta, **35**, 275 (1959).
79а. Watson D. G., Sutor D. J., Tollin P., Acta cryst., **19**, 111 (1965);
79б. Steward R. F., Jensen L. H., J. Chem. Phys., **40**, 2071 (1964).
80. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, Изд. «Мир», 1965, стр. 189.
81. Albert A., Heterocyclic Chemistry, London, 1959, p. 336—346.
82. Cochran W., Acta cryst., **4**, 81 (1951).
83. Sundaralingam M., Acta cryst., **21**, 495 (1966).
84. Kraut J., Jensen L. H., Acta cryst., **16**, 79 (1963).
85. Broomhead J. M., Acta cryst., **1**, 324 (1948); Acta cryst., **4**, 92 (1951).
86. Bugg C. E., Marih R. E., J. Mol. Biol., **25**, 67 (1967).
87. Sundaralingam M., Jensen L. H., J. Mol. Biol., **13**, 914, 930 (1965).
88. Marsh R. E., Bierstedt R., Eichhorn E. L., Acta cryst., **15**, 310 (1962).
89. Dekker C. R., Ann. Rev. Biochem., **29**, 453 (1960).
90. Tsuboi M., Kyogoku Y., Shimanouchi T., Biochim. Biophys. Acta, **55**, 1 (1962).
91. Jardetzky C. D., Jardetzky O., J. Am. Chem. Soc., **82**, 222 (1960).
92. Danyluk S., Hruska F. E., Biochemistry, **7**, 1038 (1968).
93. Bullock F. J., Jardetzky O., J. Org. Chem., **29**, 1988 (1964).
94. Katritzky A. R., Waring A. J., J. Chem. Soc., **1963**, 3046.
95. Jardetzky O., Pappas P., Wade N. C., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1657 (1963).
96. Börresen H. C., Acta Chem. Scand., **21**, 2463 (1967).
97. Clark L. B., Tinoco J., J. Am. Chem. Soc., **87**, 11 (1965).
98. Fox J. J., Shugar D., Biochim. Biophys. Acta, **9**, 369 (1952).
99. Sinsheimer R. J., Nutter R. L., Hopkins G. R., Biochim. Biophys. Acta, **18**, 13 (1955).
100. Wempen J., Duschinsky R., Kaplan L., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4755 (1961).

101. Fox J. J., Codington J. F., Yung N. C., Kaplan L., Lampen J. O., J. Am. Chem. Soc., 80, 5155 (1958).
102. Clauwaert Y., Stockx Y., Z. Naturforsch., 23b, 25 (1968).
103. Fox J. J., Wempen J., Hampton A., Doerr I. L., J. Am. Chem. Soc., 80, 1669 (1958).
104. Cavalieri L. F., Fox J. J., Stone A., Chang N., J. Am. Chem. Soc., 76, 1119 (1954).
105. Yung N. C., Burchenol J. H., Fecher R., Duschinsky R., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., 83, 4060 (1961).
106. Fox J. J., Miller N., Wempen J., J. Med. Chem., 9, 101 (1966).
107. Doerr J. L., Fox J. J., J. Org. Chem. 32, 1462 (1967).
108. Fox J. J., Van Praag D., Wempen J., Doerr I. L., Cheong L., Knoll J. E., Eidinoff M. L., Bendich A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 81, 178 (1959).
109. Матье Ж., Алле А., Принципы органического синтеза, Издатинлит, 1962, стр. 569.
110. Windmueller F., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., 236, 2716 (1961).
111. Mason S. F., The Chemistry and Biology of Purines. A Ciba Foundation Symposium, London, 1957, p. 66; J. Chem. Soc., 1954, 2071.
112. Тафт Р. У. мл., в кн. «Пространственные эффекты в органической химии», Издатинлит, 1960, стр. 562.
113. Пальм В. А., Основы количественной теории органических реакций, Изд. «Химия», 1967.
114. Wells P. R., Chem. Rev., 63, 171 (1963).
115. Jaffe H. H., Jones H. L., in «Advances in Heterocyclic chemistry», Katritzky A. R. (eds), Acad. Press, N. Y.—L., 1964, p. 209.
116. Fox J. J., Yung N., Davall J., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 78, 2117 (1956).
117. Codington J. F., Doerr J. J., Fox J. J., J. Org. Chem., 29, 558 (1964).
118. Ts'o P. O. P., Rappaport S. A., Bollum F. J., Biochemistry, 5, 4153 (1966).
119. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 309 (1960).
120. Ono J., Wilson R. G., Grossman L., J. Mol. Biol. 11, 600 (1965).
121. Johns H. E., LeBlanc J. C., Freeman K. B., J. Mol. Biol., 13, 849 (1965).
122. Philips R., Eisenberg P., George P., Rutman R. J., J. Biol. Chem., 240, 4393 (1965).
123. Edsall J. T., Wyman J., Biophysical Chemistry, Acad. Press. Jnc., v. I, New York, 1958, p. 441.
124. Физические методы в химии гетероциклических соединений, под ред. Катрицкого А. Р., Изд. «Химия», 1966.
125. Aylward N. N., J. Chem. Soc., B, 1967, 401.
126. Lewin S., Humphreys D. A., J. Chem. Soc., B, 1966, 210.
127. Сухоруков Б. И., Полтев В. И., Блюменфельд Л. А., ДАН СССР, 149, 1380 (1963).
128. Ulbricht T. L. V., Comprehensive Biochemistry, 8, 199, (1963).
129. Jordan D. O., The Chemistry of the Nucleic Acids, Butterworth, London, 1960, p. 134.
130. Levene P. A., Simms H. S., J. Biol. Chem., 65, 519 (1925).
131. Bunvill L. G., Schwalbe S. J., Biochemistry, 5, 3521 (1966).
132. Rawitscher M., Sturtevant J. M., J. Am. Chem. Soc., 82, 3739 (1960).
133. Stockx J., Vandendriessche L., Biochim. Biophys. Acta, 72, 137 (1963).
134. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, Изд. «Мир», 1965, стр. 129.

135. Стрэйтвизер Э., Теория молекулярных орбит для химиков-органиков, Изд. «Мир», 1965, стр. 291.
136. Fueno T., Ann. Rev. Phys. Chem., **12**, 303 (1961).
137. Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Шибаева Р. П., Монастырская Г. С., Кочетков Н. К., Мол. биол., **2**, 329 (1968).
138. Coburn W. C., Thorpe M. C., Montgomery J. A., Hewson K., J. Org. Chem., **30**, 1110 (1965).
139. Coburn W. C., Thorpe M. C., Montgomery J. A., Hewson K. J. Org. Chem., **30**, 1114 (1965).
140. Krupička J., Gut J., Coll. Czech. Chem. Comm., **27**, 546 (1962).
141. Chambers R. W., Biochemistry, **4**, 219 (1965).
142. Hayatsu H., Takeishi K.-I., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, **123**, 445 (1966).
143. Wolfenden R. V., J. Mol. Biol., **40**, 307 (1969).

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ *

I. ВВЕДЕНИЕ

Свойства полимерных молекул нуклеиновых кислот определяются во многом взаимодействием между составляющими их компонентами, а именно: остатками фосфорной кислоты, углеводов и гетероциклических оснований. При этом свойства молекулы, которые определяются наличием большого числа отрицательно заряженных остатков фосфорной кислоты, ничем существенно не отличаются от свойств других полимерных анионов и в той мере, в какой это в настоящее время возможно, описываются в рамках электростатических представлений. Особые специфические свойства олиго- и полинуклеотидов в основном определяются взаимодействиями между основаниями. При этом возможны два типа взаимодействий;

1) взаимодействия между плоскостями циклов соседних оснований в одной цепи (межплоскостные, вертикальные, продольные взаимодействия); они реализуются и в одноцепочечных, и в двухцепочечных молекулах;

2) взаимодействия между основаниями, расположенными в одной плоскости в разных цепях (комплементационные взаимодействия); к таким относится, в частности, образование водородных связей.

В данной главе мы рассмотрим различные типы взаимодействий, кратко останавливаясь на теоретических представлениях и на экспериментальных фактах, подтверждающих эти представления. Взаимодействия оснований друг с другом будут рассмотрены отдельно; эффекты, связанные с взаимодействием зарядов фосфатных групп, — в разделах, посвященных конкретным чертам вторичной структуры нуклеиновых кислот.

II. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДРУГ С ДРУГОМ

1. Комплементационные (поперечные) взаимодействия

В 1953 г. была выдвинута гипотеза Уотсона — Крика о двухспиральной структуре ДНК, согласно которой в противоположных це-

* См. примечание на стр. 16.

пях попарно связаны друг с другом основания аденин и тимин, гуанин и цитозин. Впоследствии было приложено немало усилий для теоретического обоснования и экспериментальных подтверждений именно этого, а не другого типа спаривания оснований, доказательства его специфичности и установления структуры пар, или, иными словами, определения взаимосвязанных атомов в комплементарных парах.

Уотсон и Крик[1] выдвинули идею о специфическом спаривании на основании имевшихся в их распоряжении данных о нуклеотидном составе различных ДНК. Из этих даных следовало, что отношения аденин : тимин и гуанин : цитозин близки к единице. Уотсон и Крик дали наиболее вероятную схему образования пар.

R—остаток дезоксирибозы

Специфичность спаривания оснований, предположенная Уотсоном и Криком, была впоследствии доказана многочисленными экспериментальными работами, на которых здесь следует остановиться, отметив сразу, что в этом разделе мы обсудим только те доказательства, которые были проведены на уровне нуклеотидов, нуклеозидов и оснований. Дополнительные доказательства специфичности взаимодействия, проведенные на уровне полинуклеотидов, будут обсуждены отдельно.

Взаимодействия между комплементарными основаниями относятся к разряду слабых взаимодействий и легко нарушаются под действием температуры или различных агентов, которые сами способны к образованию водородных связей, в частности воды. Поэтому исследования специфичности взаимодействия между основаниями проводят, как правило, в органических растворителях, таких, как четыреххлористый углерод, хлороформ, диметилсульфоксид и т. д. или в кристаллических образцах, полученных из раствора исследуемой смеси. Основными методами исследования являются ИК- и ЯМР-спектроскопия, а также рентгеноструктурный анализ.

Экспериментальные исследования специфичности взаимодействия между основаниями

ИК-Спектры. В ИК-спектре разбавленного (0,022 *М*) раствора 1-циклогексилурацила в хлороформе[2] наблюдается полоса 3392 *см*$^{-1}$, соответствующая валентным колебаниям N—H, наличие водородных связей удается обнаружить лишь при значительно более высоких концентрациях *; это следует из появления полос 3210; 3110 и 3050 *см*$^{-1}$. Аналогично в спектре 0,022 *М* раствора 9-этиладенина наблюдаются интенсивные пики, соответствующие симметричным (3416 *см*$^{-1}$) и антисимметричным (3527 *см*$^{-1}$) валентным колебаниям NH_2-группы, и только слабые полосы, отвечающие образованию водородно-связанных гомоассоциатов (3482 и 3312 *см*$^{-1}$). Интенсивность последних двух полос увеличивается в насыщенном растворе.

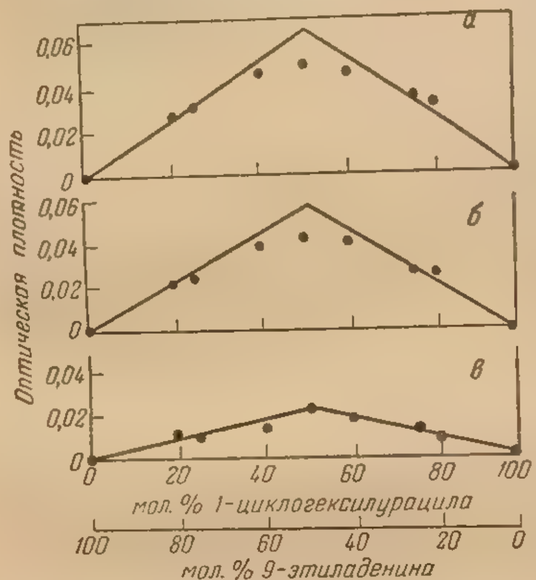


Рис. 4.1. Зависимость оптической плотности полос при 3330 *см*$^{-1}$ (*а*), 3490 *см*$^{-1}$ (*б*) и 3260 *см*$^{-1}$ (*в*), образующихся при смешении 1-циклогексилурацила и 9-этиладенина в дейтерохлороформе, от состава смеси[2]. Суммарная концентрация компонентов 0,022 *М*. Длина оптического пути 1 *мм*; 20° С.

В смеси 1-циклогексилурацила и 9-этиладенина с общей концентрацией 0,022 *М* наблюдаются относительно сильные полосы при 3490 и 3330 *см*$^{-1}$, а также слабая полоса при 3260 *см*$^{-1}$, что свидетельствует об образовании водородных связей в значительно более выраженной степени, чем для растворов индивидуальных соединений. Исследование зависимости интенсивности этих новых полос от состава смеси при постоянной суммарной мольной концентрации обоих компонентов приводит к выводу, что состав образующегося комплекса соответствует отношению 1 : 1 (рис. 4.1).

Аналогичные результаты получены[4] и при изучении взаимодействия 2′, 3′-О-бензилиден-5′-О-тритилпроизводных гуанозина и цитидина в $CDCl_3$. В данном случае отмечена, однако, довольно значительная степень гомоассоциации производного гуанозина; тем не

* Образование водородных связей между молекулами урацила наблюдается также и в кристаллическом состоянии, как можно судить, например, из данных рентгеноструктурного анализа кристаллов 1-метилтимина[5].

менее образование комплекса с производным цитидина выражено сильнее. Исследование состава образующегося комплекса, выполненное аналогично описанному выше (характерные частоты 3488 и 3300 *см*$^{-1}$), приводит к стехиометрическому отношению компонентов, равному 1 : 1.

Образование подобных комплексов представляет собой равновесную реакцию, и при уменьшении концентрации смеси равновесие сдвигается в сторону исходных компонентов. Так, при суммарной концентрации компонентов $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ *моль/л* образования комплексов между 9-этиладенином и 2′, 3′, 5′-О-триацетилуридином, а также между 9-этиладенином и 3′, 5′-О-диацетилтимидином в $CDCl_3$ обнаружить не удается. Однако в этом же интервале концентраций 2′,3′,5′-О-триацетилгуанозин образует комплексы состава 1 : 1 с 1-метилцитозином, диметил-5-азацитозином и 2′,3′,5′-О-трибензоил-6-азацитидином[5]. Данное различие связано с большей энергией взаимодействия пары гуанин · цитозин по сравнению с парой аденин · урацил (см. ниже).

Образование водородно-связанных комплексов не было обнаружено в растворах смесей 9-этиладенина с 2′,3′-О-бензилиден-5′-О-тритилцитидином и гуанозином в дейтерохлороформе при суммарных концентрациях компонентов 0,0016 и 0,0080 *М*, а также в смесях 2′, 3′-О-бензилиден-5′-О-тритилгуанозина с циклогексилурацилом в тех же условиях и при тех же суммарных концентрациях[4].

Таким образом, производные оснований нуклеиновых кислот специфически взаимодействуют друг с другом, образуя предпочтительно водородно-связанные пары аденин · урацил и гуанин · цитозин *.

Спектры ЯМР. Как известно, в спектрах ЯМР различных соединений сигнал от протонов, участвующих в образовании водородных связей, сдвигается в сторону более слабых полей по сравнению с несвязанными протонами[6]. Использование этой закономерности для изучения специфичности образования водородно-связанных пар между основаниями нуклеиновых кислот[7–9] приводит к подтверждению выводов, сделанных на основании ИК-спектров.

На рис. 4.2 в качестве примера приводится сопоставление спектров ЯМР 1-метилцитозина, 9-этилгуанина и их эквимольной смеси в диметилсульфоксиде. Из данных, приведенных на рисунке, следует, что в образовании водородных связей участвуют протоны аминогрупп цитозина и гуанина и иминогруппы гуанина. Аналогичные изменения в спектрах ЯМР по сравнению со спектрами индивидуальных оснований происходят при смешении в этом же

---

* Специфическое образование водородных связей наблюдалось также между 2′,3′-О-бензилиден-5′-О-тритилинозином и 2′,3′-О-бензилиден-5′-О-тритилцитидином в растворах хлороформа[817].

растворителе 1-метилтимина и 9-этиладенина, 1-метилтимина и 2-аминоаденозина, тогда как при смешении неспецифических пар никаких изменений в спектрах не происходит и спектр смеси соответ-

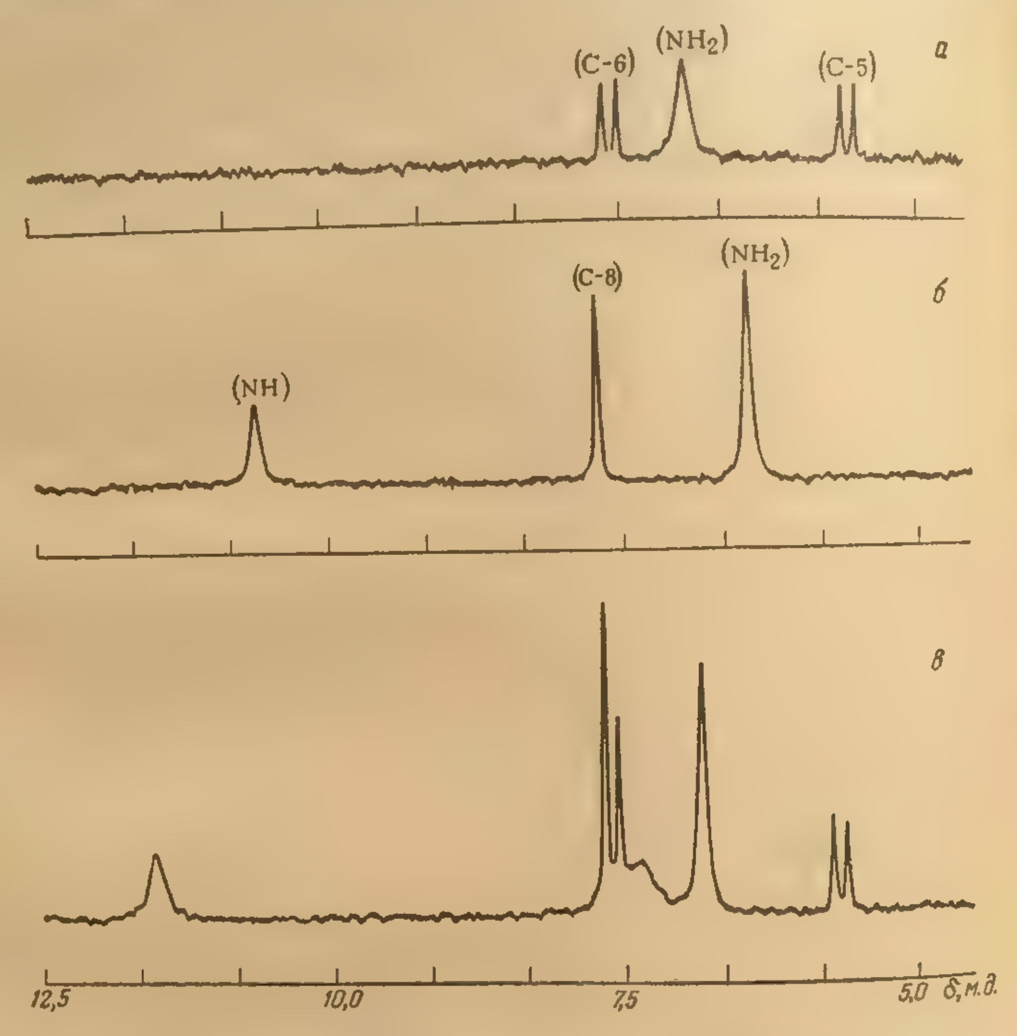


Рис. 4.2. Спектры протонного магнитного резонанса 1-метилцитозина (*а*), 9-этилгуанина (*б*) и их эквимольной смеси (*в*) в полностью дейтерированном диметилсульфоксиде. Суммарная концентрация компонентов во всех случаях 0,2 *моль/л*; 20° С [7].

ствует суммарному спектру индивидуальных оснований в соответствующих концентрациях [7, 8] (табл. 4.1).

Из результатов, представленных в табл. 4.1, видно, что величина изменения химического сдвига при смешивании растворов соответствующих оснований значительно меньше в случае образования пары 9-этиладенин + 1-метилтимин, чем в случае образова-

ния пары 9-этилгуанин + 1-метилцитозин. Это свидетельствует о более слабом взаимодействии между основаниями в первой паре.

Тот же вывод, но с еще большей очевидностью следует и из спектров ЯМР смесей нуклеозидов и их аналогов в различных растворителях[8]. Так, если гуанозин с цитидином сильно взаимодействуют в диметилсульфоксиде, то взаимодействие между 9-этиладенином и 1-циклогексилурацилом удается наблюдать лишь в малополярных растворителях, например в дейтерохлороформе[8]. Тем не менее и в этом случае специфичность взаимодействия сохраняется. Следует отметить, что при высоких концентрациях наблюдается также незначительная гомоассоциация производных аденина и гуанина.

Таблица 4.1. **Специфичность образования водородно-связанных пар оснований[7] по данным ЯМР**

Пары оснований	Концентрация оснований, *моль/л*	Температура, °С	Величина химического сдвига протонов группировок по сравнению с одним основанием, м. д.				
			NH (9-этилгуанина)	NH_2 (9-этилгуанина)	NH_2 1-метилцитозина	NH 1-метилтимина	NH_2 9-этиладенина
9-Этилгуанин + 1-метилцитозин	0,1 + 0,1	40	0,5	0,24	0,29	—	—
	0,1 + 0,1	20	0,71	0,34	0,36	—	—
	0,2 + 0,2	40	0,7	0,34	0,46	—	—
	0,2 + 0,2	20	0,94	0,41	0,43	—	—
9-Этиладенин + 1-метилтимин	0,1 + 0,1	20	—	—	—	0,05	0,02
	0,2 + 0,2	20	—	—	—	0,08	0,02
9-Этилгуанин + 1-метилтимин	0,2 + 0,2	20	0,00	0,00	—	0,00	—
9-Этилгуанин + 9-этиладенин	0,2 + 0,2	20	0,02	0,00	—	—	0,00

Из табл. 4.1 видно также, что при увеличении концентрации компонентов и понижении температуры[7,8] взаимодействие оснований усиливается.

Итак, совокупность данных ИК- и ЯМР-спектроскопии свидетельствует о строгой специфичности при образовании пар оснований в полном соответствии с гипотезой Уотсона—Крика. Однако о структуре образующихся пар на основании этих данных можно сделать вывод лишь в случае пары гуанин · цитозин, где оба метода показывают[5,7,8], что в образовании водородной связи принимают участие аминогруппы гуанина и цитозина и иминогруппа гуанина. Это возможно только при условии, что структура пары

соответствует изображенной ниже структуре, которая была предложена Полингом [10].

R—различные радикалы

Более строго структура пар оснований может быть определена рентгеноструктурным методом, однако при этом, конечно, следует иметь в виду, что влияние сил упаковки в кристалле может внести изменения по сравнению со структурой этой же пары в растворе.

по Хугстину;

по Хашемейеру („обратная“ структуре по Хугстину)

по Уотсону и Крику

„обратная“ структуре по Уотсону и Крику

Рис. 4.3. Возможные структуры пары аденин · урацил (и их производных; названия пáрам даны по имени исследователей, расшифровавших их структуру — см. табл. 4.2.).

Рентгеноструктурный анализ *. Этим методом удалось установить структуру пар аденин · тимин и аденин · урацил (и их производных), для которых данные ИК- и ЯМР-спектроскопии не дают однозначных выводов.

* Обзор — см. [11].

В принципе возможно существование четырех «изомерных» пар аденин · тимин или аденин · урацил (рис. 4.3).

Из рентгеноструктурных данных, приведенных в табл. 4.2, видно, что при взаимодействии производных гуанина и цитозина в кристаллах образуется пара в соответствии с предложенной Полингом [10] структурой. Структура образующейся в кристаллах пары аденин · урацил (точнее, производных этих оснований) никогда не отвечает структуре Уотсона и Крика и соответствует либо модели Хугстина, либо модели Хашемейера (в зависимости от заместителей в ядрах взаимодействующих оснований).

Таблица 4.2. **Образование водородно-связанных комплексов между парами оснований по данным рентгеноструктурного анализа**

Компоненты комплекса	Атомные группы, участвующие в образовании водородной связи		Длина водородной связи, Å	Тип образующегося комплекса	Литература
	в пуриновом компоненте	в пиримидиновом компоненте			
9-Метиладенин + + 1-метилтимин	6-*экзо*-NH_2 N-7	4-*экзо*-O H при N-3	2,85 2,92	По Хугстину	*12*
9-Этиладенин + +1-метилурацил	6-*экзо*-NH_2 N-7	4-*экзо*-O H при N-3	2,98 2,83	По Хугстину	*13*
9-Метиладенин + + 1-метил-5-бромурацил	6-*экзо*-NH_2 N-7	4-*экзо*-O H при N-3	2,98 2,86	По Хугстину	*14*
9-Этиладенин + + 1-метил-5-фторурацил	6-*экзо*-NH_2 N-7	4-*экзо*-O H при N-3	2,96 2,78	По Хугстину	*15*
Аденозин + 5-бромуридин	6-*экзо*-NH_2 N-7	2-*экзо*-O H при N-3	3,10 2,80	По Хашемейеру	*16*
9-Этиладенин + + 1-метил-5-бромурацил	6-*экзо*-NH_2 N-7	2-*экзо*-O H при N-3	3,04 2,80	По Хашемейеру	*17*
9-Этилгуанин + + 1-метилцитозин	6-*экзо*-O H при N-1 2-*экзо*-NH_2	4-*экзо*-NH_2 N-3 2-*экзо*-O	2,93 2,91 2,82	По Уотсону и Крику	*18, 19*
9-Этилгуанин + + 1-метил-5-бромцитозин	6-*экзо*-O H при N-1 2-*экзо*-NH_2	4-*экзо*-NH_2 N-3 2-*экзо*-O	2,86 2,95 2,91	По Уотсону и Крику	*20*
2'-Дезоксигуанозин + 5-бромдезоксицитидин	6-*экзо*-O H при N-1 2-*экзо*-NH_2	4-*экзо*-NH_2 N-3 2-*экзо*-O	2,82 2,91 2,78	По Уотсону и Крику	*21*
9-Этилгуанин + + 1-метил-5-фторцитозин	6-*экзо*-O H при N-1 2-*экзо*-NH_2	4-*экзо*-NH_2 N-3 2-*экзо*-O	2,96 2,94 2,82	По Уотсону и Крику	*19, 22*

Заключаются ли причины такой схемы образования пары в особенностях энергетики взаимодействия оснований или в требованиях кристаллической упаковки, в настоящее время не вполне ясно.

Значительный интерес для понимания природы сил, стабилизирующих комплементарные пары, является также структура гомоассоциатов, поскольку образование комплементарных пар является реакцией, конкурирующей с образованием гомоассоциатов. На

а б

в г

Рис. 4.4. Структуры гомоассоциативных димеров производных оснований в кристаллическом состоянии:

а — гомоассоциативный димер 1-метилтимина ($R = CH_3$) и 1-метилурацила ($R = H$) [23]; *б* — 1-метилцитозина [24]; *в* — 9-метиладенина [25]; *г* — димер гуанина (по данным рентгенографии кристаллов гуанинийхлорида) [26].

рис. 4.4 приведены полученные на основе рентгеноструктурных данных [23–27] структуры водородно-связанных димеров, образующихся при кристаллизации различных производных оснований нуклеиновых кислот (обсуждение см. [27]). Во всех случаях образующиеся димеры связаны двумя водородными связями. Для ассоциатов урацила и аденина это положение сохраняется, по-видимому, и для растворов в дейтерохлороформе, как это явствует из термодинамических характеристик, полученных методом ИК-спектроскопии [28] (хотя структура комплексов в этой работе не доказывается).

Таким образом, как следует из приведенных качественных данных, во всех разобранных случаях образование комплементарных пар более выгодно, чем образование гомоассоциатов. Этот вывод подтверждается и количественными исследованиями констант ассоциации.

Количественные характеристики взаимодействия оснований при образовании водородно-связанных пар. Из данных ИК-спектров можно вычислить значения констант гомоассоциации различных производных оснований, а также констант образования водородно-связанных комплексов между комплементарными основаниями. Значения этих констант для некоторых соединений приводятся в табл. 4.3 и 4.4. Легко видеть, что константы образования комплементарных пар значительно выше констант гомоассоциации.

Таблица 4.3. **Константы гомоассоциации ряда производных 1-циклогексилурацила и 9-этиладенина**[29] **(по данным ИК-спектров в дейтерохлороформе при 25°С)**

Производное 1-циклогексилурацила	$K_{ассоц}$, *л/моль*	Производное 9-этиладенина	$K_{ассоц}$, *л/моль*
3-Метил-	0	6-*экзо*-N, N-Диметил-	0
5,6-Дигидро-	2,9	6-*экзо*-N-Метил-	1,5
4-Тио-	2,7	Незамещенный	3,1
Незамещенный	6,1	6-Дезамино-2-амино- (2-аминопурин)	2,0
5-Метил	3,2	2-Амино-	11
5-Бром-	4,1	8-Бром-	120
5-Иод-	5,7		

Калориметрические определения дают для константы ассоциации между 1-циклогексилурацилом и 9-этиладенином величину 92 *л/моль*, тогда как величины констант гомоассоциации 1-циклогексилурацила и 9-этиладенина соответственно равны 19 и 13 *л/моль*[30]. Меньшая величина констант гомоассоциации по сравнению с константами образования пар получена также[31] при исследовании образования комплементарных пар между 2′,3′-О-изопропилиден-5′-О-тритильными производными аденозина и уридина в CCl_4. Однако в этом случае величина констант примерно в 10 раз выше, чем в $CDCl_3$, что связано, очевидно, с меньшей полярностью CCl_4 и с его меньшей способностью к образованию водородных связей с растворенными веществами.

Значительно сильнее взаимодействие при образовании пары гуанин · цитозин (как это следует и из качественных данных). Приближенно оцененная величина константы образования комплекса между 1-метилцитозином и 2′,3′,5′-О-триацетилгуанозином[5]

составляет ~10^5 *л/моль* в $CDCl_3$, что примерно в 1000 раз больше величины соответствующей константы пары аденин · урацил.

Таблица 4.4. **Константы образования комплексов между производными 1-циклогексилурацила и 9-этиладенина** [29] **(по данным ИК-спектров в дейтерохлороформе при 25° С)**

Пиримидиновое основание	$K_{компл}$, *л/моль*					
	с 6-*экзо*-N, N-диметил-9-этиладенином	с 6-*экзо*-N-метил-9-этиладенином	с 9-этиладенином	с 2-амино-9-этилпурином	с 2-амино-9-этиладенином	с 8-бром-9-этиладенином
3-Метил-1-циклогексилурацил	—	—	< 1	—	—	—
1-Циклогексил-5,6-дигидроурацил	—	15	30	10	100	—
1-Циклогексил-4-тиоурацил . . .	—	—	90	—	—	—
1-Циклогексилурацил	1,5	50	100 (150±50 [24])	45	170 (300±100 [24])	140
1-Циклогексилтимин	—	70	130	56	210	—
5-Бром-1-циклогексилурацил .	—	100	240 (350±75 [24])	75	550 (600±150 [24])	—
5-Иод-1-циклогексилурацил .	—	—	220	—	—	—

Сильная ассоциация наблюдается также между производными гипоксантина и цитозина. Константа ассоциации при 25° С в хлороформе для 2′,3′-бензилиден-5′-О-тритилинозина и 2′,3′-бензилиден-5′-О-тритилцитидина, по данным ИК-спектров [317], составляет $2 \cdot 10^3$ *л/моль*.

Можно отметить следующие закономерности во влиянии заместителей на константу образования пар.

1. Введение метильных заместителей по N-3 в молекуле урацила или по экзоциклической аминогруппе аденина предотвращает образование пары; это означает, что в незамещенных соединениях протоны при N-3 участвуют в образовании водородной связи.

2. Насыщение в пиримидиновом цикле двойной связи С-5—С-6 резко уменьшает стабильность комплекса, что связано, возможно, с уменьшением положительного характера водорода при N-3 (как это следует из факта увеличения рK_a дигидроурацила по сравнению с урацилом; см. стр. 190) и соответственно с понижением тенденции к образованию водородной связи.

3. Определенных закономерностей в стабильности комплекса при введении заместителя в положение 5 урацильного остатка не

наблюдается. Так, и электронодонорный (CH_3), и электроноакцепторные заместители (Br, I) приводят к увеличению стабильности комплексов замещенных урацилов по сравнению с незамещенными.

Особо нужно подчеркнуть, что не существует прямой зависимости между числом водородных связей и стабильностью комплекса. Действительно, несмотря на то что и в димерных, гомоассоциатах урацила и аденина, и в комплексе аденин·урацил число водородных связей одинаково, комплекс пары значительно более стабилен, чем гомоассоциаты. Аналогично при одинаковом числе водородных связей в комплексе производных 2-аминопурина с производными урацила и в соответствующих комплексах аденина (6-аминопурина) последние являются в 2 раза более стабильными. Наконец, вопреки данным ИК-[29, 32] и ЯМР-спектроскопии[7], из которых следует, что при взаимодействии 2,6-диаминопурина и урацила образуются три водородные связи, стабильность возникающего комплекса много ниже, чем стабильность комплекса гуанин·цитозин. Таким образом, помимо числа водородных связей в стабилизации комплексов важную роль играют, по-видимому, и другие силы. В настоящее время принято считать, что это ван-дер-ваальсово-лондоновские взаимодействия между расположенными в одной плоскости основаниями.

Теоретическое рассмотрение проблемы стабильности водородно-связанных пар

Рассмотрение приведенных экспериментальных данных приводит к необходимости ответить на вопрос, почему при равном числе водородных связей одни ассоциаты более стабильны, чем другие. Удовлетворительный ответ может быть получен, исходя из современных теоретических представлений о роли ван-дер-ваальсово-лондоновских сил в стабилизации комплексов, образованных водородными связями. Для оценки энергии взаимодействия, возникающего за счет этих сил между основаниями, в настоящее время существуют два подхода.

Первый из них[33] рассматривает взаимодействующие основания как два диполя и в соответствии с этим под ван-дер-ваальсово-лондоновскими силами подразумевает суммарный эффект, вызываемый диполь-дипольными взаимодействиями, взаимодействиями между диполем одного основания и индуцированным диполем другого и дисперсионными (лондоновскими) взаимодействиями, т. е. взаимодействиями между флуктуационно-возникшим диполем и индуцированным им диполем. Дополнительный вклад в энергию взаимодействия вносят рассматриваемые независимо водородные связи. Такой подход дает возможность лишь для очень грубой оценки, поскольку основания в комплементарной паре расположены

слишком близко друг к другу, чтобы их можно было рассматривать как два независимых диполя.

Более корректным, по-видимому, является другой подход — рассматривать взаимодействие оснований в паре как суммарный эффект взаимодействия отдельных атомов одного основания с атомами другого. При этом под ван-дер-ваальсово-лондоновскими взаимодействиями подразумевается суммарный эффект кулоновского взаимодействия между частичными зарядами атомов двух оснований (соответствующие силы обозначают $F_{\rho\rho}$), взаимодействия между частичными зарядами атомов одного основания и индуцированными ими диполями в другом основании ($F_{\rho\alpha}$) и, наконец, дисперсионные силы взаимодействия (лондоновские F_L) между флуктуационно-возникающим диполем на одном основании и индуцируемыми им диполями на другом. Общая энергия взаимодействия оснований E_m, таким образом, выразится суммой:

$$E_m = E_{\rho\rho} + E_{\rho\alpha} + E_L$$

Каждая из этих составляющих энергетических величин может быть оценена независимо. Наибольший вклад в сумму вносит член $E_{\rho\rho}$, который рассчитывают исходя из вычисленного квантовохимически распределения частичных σ- и π-зарядов между атомами оснований (см. гл. 3).

В табл. 4.5 приводятся значения энергии взаимодействия между различными основаниями, вычисленные для экспериментально определенных конфигураций соответствующих гомоассоциатов или пар, а также для некоторых других вероятных (с точки зрения возможности образования водородных связей) конфигураций. Расчеты такого рода правильно предсказывают, что стабильность пар аденин · тимин по Хугстину и Хашемейеру (вторая и третья пары в табл. 4.5) выше, чем пары по Уотсону и Крику (первая пара в таблице), и выше стабильности любого из димерных гомоассоциатов аденина и тимина. Правильно предсказывается также значительно более высокая стабильность пары гуанин · цитозин по сравнению с парой аденин · тимин и с любой из гомоассоциативных пар гуанина и цитозина. Это означает, что из мономерных единиц будет происходить преимущественное образование пар аденин · тимин и гуанин · цитозин по сравнению с образованием гомоассоциатов.

Энергия пар гуанин · тимин (—7,40 *ккал/моль*) и аденин · цитозин (—7,75 *ккал/моль*) ниже энергии образования гомоассоциатов гуанозина (—14,52 *ккал/моль*) и цитозина (—12,97 *ккал/моль*), т. е. образование гетерогенных пар в этом случае менее выгодно по сравнению с образованием гомоассоциатов. Расчеты также в основном правильно предсказывают структуру гомоассоциатов оснований в кристаллическом состоянии. Подобные результаты, но с учетом только электростатического взаимодействия получены также в работах[34, 35].

Таблица 4.5. **Энергетические характеристики взаимодействия пар оснований и гомоассоциатов** [27]

Взаимодействующие основания	Атомные группы, участвующие в образовании водородной связи: в пуриновом компоненте	в пиримидиновом компоненте	$E_{\rho\rho}$, ккал/моль	$E_{\rho\alpha}$, ккал/моль	E_L, ккал/моль	E_m, ккал/моль
Аденин + тимин	N-1 6-*экзо*-NH_2	H при N-3 4-*экзо*-O	−4,6	−0,2	−0,7	−5,5
	N-7 6-*экзо*-NH_2	H при N-3 4-*экзо*-O	−5,9	−0,2	−0,9	−7,0
	N-7 6-*экзо*-NH_2	H при N-3 2-*экзо*-O	−5,6	0,15	−0,9	−6,65
Гуанин + цитозин	2-*экзо*-NH_2 H при N-1 6-*экзо*-O	2-*экзо*-O N-3 4-*экзо*-NH_2	−15,91	−2,02	−1,25	−19,18
Аденин + аденин	6-*экзо*-NH_2 N-1	N-1 6-*экзо*-NH_2	−5,23	−0,11	−0,45	−5,79
Гуанин + гуанин	H при N-1 6-*экзо*-O	6-*экзо*-O H при N-1	−13,37	−0,62	−0,53	−14,52
	2-*экзо*-NH_2 N-7	N-7 2-*экзо*-NH_2	−5,79	−0,73	−0,63	−7,15
Тимин + тимин	H при N-3 4-*экзо*-O	4-*экзо*-O H при N-3	−3,62	−0,38	−1,19	−5,19
	H при N-3 2-*экзо*-O	2-*экзо*-O H при N-3	−2,61	−0,15	−1,10	−3,86
Цитозин + цитозин	N-3 4-*экзо*-NH_2	4-*экзо*-NH_2 N-3	−10,65	−1,09	−1,23	−12,97
Аденин + цитозин	6-*экзо*-NH_2 N-7	N-3 4-*экзо*-NH_2	−6,20	−0,59	−0,96	−7,75
Гуанин + тимин	H при N-1 6-*экзо*-O	2-*экзо*-O H при N-3	−4,41	−0,50	−0,58	−5,49
	H при N-1 6-*экзо*-O	4-*экзо*-O H при N-3	−6,24	−0,58	−0,58	−7,40

Приведенный расчет относится к уже фиксированным конфигурациям пар оснований и не исключает вероятности того, что с точки зрения энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий имеются и другие, более выгодные конфигурации. Поэтому интересно проследить за изменением энергии взаимодействия при изменении относительного положения оснований [35]. Это можно сделать, фиксировав положение одного из оснований и, самым разнообразным образом меняя положение другого, поставив только одно ограничивающее условие: атомы оснований не должны сближаться на расстояние, меньшее суммы их ван-дер-ваальсовых радиусов. Рассчитанные энергии кулоновского взаимодействия в зависимости от взаимного расположения оснований имеют ярко выраженные

минимумы, соответствующие конфигурациям пар, связанных водородными связями. Следует отметить, что в расчетах такого рода не учитывается образование водородных связей между атомами и рассматриваются только электростатические взаимодействия. Тем не менее получающиеся наиболее стабильные конфигурации соответствуют традиционным конфигурациям связанных водородными связями пар.

Эти расчеты не учитывают эффектов, связанных с растворителем. Кроме того, здесь используются в качестве исходных данных суммарные σ- и π-электронные плотности, рассчитываемые квантовохимическим путем, что, как было показано в предыдущей главе, не очень точно *. Однако близкое соответствие экспериментальным данным позволяет сделать вывод, что в поперечном взаимодействии между основаниями главными стабилизирующими силами являются именно ван-дер-ваальсово-лондоновские силы.

III. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Если в неводных растворах и в кристаллическом состоянии основания, нуклеозиды и нуклеотиды ассоциируют путем образования водородных связей, то в водных растворах взаимодействий между мономерными компонентами нуклеиновых кислот (и их аналогами) не наблюдается, как это следует, например, из изучения спектров комбинационного рассеяния смесей комплементарных нуклеозидов при концентрации 1,0 *М* [36]. Тем не менее в водных растворах для мономеров наблюдается сильная ассоциация вертикального типа, при которой основания, располагаясь друг над другом в параллельных плоскостях, образуют «стопку» (межплоскостные взаимодействия). Ниже рассмотрены экспериментальные доказательства и кратко теоретическая трактовка этого типа взаимодействия.

1. Ассоциация и гомоассоциация оснований, нуклеозидов и нуклеотидов

Одной из первых работ, в которых было показано существование ассоциатов оснований и нуклеозидов, явилось исследование изменения давления пара раствора с изменением концентрации пурина, уридина и цитидина [37]. В результате были определены константы равновесия ассоциации и установлено, что образуются на-

* Тем не менее расчеты взаимодействия между основаниями, выполненные с использованием различных распределений электронных плотностей (полученных с использованием различных методов разными авторами), дают близкие качественные картины зависимости энергии взаимодействия от взаимного расположения оснований [35].

боры ассоциатов, содержащих различное число мономеров (в соответствии с серией равновесий). Константы равновесия ассоциации, полученные в этой работе, а также в последующих работах подобного рода [38–40], приведены в табл. 4.6. Из сопоставления их величин можно сделать следующие выводы.

Таблица 4.6. **Константы гомоассоциации оснований и нуклеозидов (по данным изменения давления пара водных растворов при 25° С)**

Соединение	$K_{ассоц}$, *моль*$^{-1}$	Литература
Инозин	3,0	*40*
	1,8 *	*38*
1-Метилинозин	1,8–2,0	*38*
Пурин	2,1	*37*
Рибозилпурин	1,9	*38*
	3,5 **	*40*
Аденозин	4,5	*38*
2′-О-Метиладенозин	5,1	*38*
2′-Дезоксиаденозин	4,7–7,5	*38*
	12	*40*
6-Метилпурин	6,7	*39*
6-*экзо*-N-Метиладенозин	11,8–14,9	*38*
6-*экзо*-N-Метил-2′-дезоксиаденозин	15,9	*38*
6-*экзо*-N, N-Диметиладенозин	22,2	*38*
Уридин	0,61	*38*
	0,70	*40*
Цитидин	0,87	*38*
5-Бромуридин	1,0	*39*
Тимидин	0,91 ***	*40*
2′-Дезоксицитидин	0,91	*40*
9-Метилпурин	1,8	*50*
9-Этилпурин	2,06	*50*
9-Изопропилпурин	2,28	*50*
9-*трет*-Бутилпурин	2,49	*50*
6-*трет*-Бутилпурин	8,72	*50*
2-*трет*-Бутилпурин	9,18	*50*
8-Изопропилпурин	4,37	*50*

* Значение $K_{ассоц}$ определялось [40] также по изменению константы седиментации в зависимости от концентрации при ультрацентрифугировании и оказалось равным 2,0.

** Значение $K_{ассоц}$, определенное [40] по коэффициенту седиментации, равно 1,7.

*** Значение $K_{ассоц}$, определенное [40] по коэффициенту седиментации, равно 1,2.

1. Ассоциация вызвана не водородными связями, поскольку наблюдаемые изменения в величинах константы ассоциации в рядах

2′-дезоксиаденозин < 6-*экзо*-N-метил-2′-дезоксиаденозин

аденозин < 6-*экзо*-N-метиладенозин < 6-*экзо*-N, N-диметиладенозин

инозин < 1-метилинозин

противоположны тем, которые должны наблюдаться при замещении на алкильную группу протонов, способных к образованию водородных связей.

2. Остаток сахара не оказывает значительного влияния на величину взаимодействия, как это следует из сравнения значений константы равновесия пурина, рибозилпурина, а также рибо-, дезоксирибо- и 2′-O-метилрибопроизводных, так что ассоциация является в основном специфическим свойством оснований.

3. Введение метильного заместителя или галогена в гетероциклическое ядро увеличивает величину константы ассоциации.

Образование ассоциатов происходит также в растворах смесей нуклеозидов, однако по данным об изменении давления пара[40] нельзя оценить взаимодействие между различными основаниями. Константы ассоциации между различными основаниями можно определить по изменению растворимости одних оснований в присутствии других. Полученные таким путем значения приведены ниже (при 25,5 °C):

Взаимодействующая пара	$K_{ассоц}$, $моль^{-1}$	Взаимодействующая пара	$K_{ассоц}$, $моль^{-1}$
Аденин + пурин	9,3	Аденин + фенол	2,3—3,1
Аденин + цитозин	4,6—5,0	Тимин + пурин	1,6—2,3
Аденин + уридин	4,3—4,9	Тимин + уридин	1,1—1,2
Аденин + пиримидин	1,8—2,3	Тимин + пиримидин	0,8—0,9

Эти результаты показывают, что и в случае различных оснований образование водородных связей вряд ли играет существенную роль, поскольку константа взаимодействия между комплементарной парой аденин + урацил, например, не превосходит по величине константу гомоассоциации аденина, которую можно оценить по значению константы взаимодействия пары аденин + пурин.

Сопоставление приведенных выше данных по ассоциации между различными основаниями и данных по гомоассоциации (см. табл. 4.6) позволяет заключить, что в водных растворах степень ассоциации уменьшается в ряду

Пуриновое основание + Пуриновое основание > Пуриновое основание + Пиримидиновое основание > Пиримидиновое основание + Пиримидиновое основание

причем

Аденин + Аденин > Тимин + Тимин ≥ Цитозин + Цитозин > Урацил + Урацил

Следует отметить также, что для гуанина гомоассоциация, по-видимому, выражена сильнее, чем для других оснований, как это следует из сильных отклонений свойств даже разбавленных растворов дезоксигуанозина от идеальных[40]. Введение фосфатного остатка не предотвращает гомоассоциации, о чем можно судить, например, по результатам изучения седиментационных равновесий растворов аденозин-5′-фосфата[41].

Совокупность рассмотренных данных, таким образом, дает информацию о степени взаимодействия между основаниями, но не позволяет ничего сказать о взаимном расположении взаимодействующих оснований в образующемся комплексе. Информация такого рода может быть получена на основе анализа изменения спектров ЯМР растворов различных пуриновых и пиримидиновых производных в D_2O в зависимости от их концентрации (см. ниже).

2. Термодинамические константы гомоассоциации пуриновых и пиримидиновых производных

Для некоторых пуриновых и пиримидиновых производных рассчитаны энтальпии и энтропии гомоассоциации[42, 43]. Эти величины приведены в табл. 4.7.

Таблица 4.7. **Термодинамические константы гомоассоциации некоторых пуриновых и пиримидиновых производных (в воде при 25° С)**

Соединение	ΔH, *ккал/моль*	Литература	ΔS, э. е.	Литература	ΔF, *ккал/моль*	Литература
Пурин	−4,2±0,2	*42*	−13	*42*	−0,44	*39*
6-Метилпурин	−6,0±0,4	*42*	−16	*42*	−1,12	*39*
Пуринрибозид	−2,5±0,1	*43*	−7	*43*	−0,380	*38*
Дезоксиаденозин	−3,7±0,6	*43*	−7	*43*	−1,5	*40*
Цитидин	−2,8±0,1	*43*	−10	*43*	0,080	*37*
Уридин	−2,7±0,1	*43*	−10	*43*	0,290	*37*

Легко видеть, что нет корреляции между изменениями свободной энергии взаимодействия и энтальпийными изменениями. Все соединения имеют значительно различающиеся величины энтропии гомоассоциации.

3. Концентрационные изменения оптических свойств растворов мономерных компонентов нуклеиновых кислот

Взаимодействие оснований в водных растворах приводит также к отклонению оптических свойств таких растворов от аддитивности. Так, например, при увеличении концентрации растворов

дезоксиаденозина наблюдается[40] заметное уменьшение мольного коэффициента экстинкции * (pH 6, 7):

C, моль/л	$\varepsilon_{259,5}$ ммк$\cdot 10^{-3}$	ε_{207} ммк$\cdot 10^{-3}$	C, моль/л	$\varepsilon_{259,5}$ ммк$\cdot 10^{-3}$	ε_{207} ммк$\cdot 10^{-3}$
$2,75 \cdot 10^{-4}$	15,3	21,0	$2,36 \cdot 10^{-2}$	13,9	—
$7,64 \cdot 10^{-3}$	15,0	—	$3,04 \cdot 10^{-2}$	13,7	19,3
$1,02 \cdot 10^{-2}$	14,4	20,0	$4,25 \cdot 10^{-2}$	13,2	—
$2,06 \cdot 10^{-2}$	14,1	19,9	$4,50 \cdot 10^{-2}$	13,1	—

Эти данные свидетельствуют об образовании гомоассоциатов.

4. Концентрационные изменения спектров ЯМР растворов оснований и нуклеозидов

При увеличении концентрации пуриновых производных в водных растворах наблюдаются заметные сдвиги сигналов протонного резонанса в сторону сильных полей, причем величина сдвига тем

Таблица 4.8. **Зависимость величин химического сдвига протонов от концентрации соединений в D_2O [38] (изменение концентрации от 0 до 0,2 *М*; частота генератора 60 *Мгц*)**

Соединение	Температура, °C	Δδ, гц					$K_{ассоц}$, моль$^{-1}$
		протоны при C-2	протоны при C-8	протоны при C-6	протоны при C-1′	протоны CH_3	
Инозин	32	6,4	5,3	—	7,1	—	—
1-Метилинозин	33	8,9	6,4	—	6,8	5,3	1,8—2
Пурин	25—27	12,6	9,6	14,2	—	—	2,1
6-Метилпурин	25—27	19,4	13,3	—	—	17,0	6,7
Рибозилпурин	30	10,7	6,4	13,1	8,8	—	1,9
Аденозин *	32	14,8	8,3	—	6,9	—	4,5
2′-Дезоксиаденозин	30	19,8	13,0	—	13,6	—	4,7—7,5
6-*экзо*-N-Метил-2′-дезоксиаденозин	32	26,0	15,8	—	14,0	15,2	15,9
6-*экзо*-N, N-Диметиладенозин	28	27,2	14,5	—	14,4	25,5	22,2
6-*экзо*-N-Метиладенозин	26	32,8	17,5	—	12,6	18,1	11,8—14,9
2′-Дезоксиаденозин *	30	14,8	10,0	—	9,8	—	4,7—7,5
2′-O-Метиладенозин	31	13,7	7,5	—	8,8	—	5,1
3′-Дезоксиаденозин *	25	15,8	9,0	—	9,6	—	—

* Изменение концентрации от 0 до 0,1 *М*.

* Ассоциация с изменением адсорбции и дисперсии оптического вращения описана также для гуанозин-3′- и гуанозин-5′-фосфатов[44, 45], изогуанозина[46]. Однако в этих случаях, по-видимому, помимо чистого взаимодействия между плоскостями оснований происходит образование высокополимерных комплексов, связанных водородными связями.

больше, чем больше значение константы ассоциации данного основания (табл. 4.8). Эти эффекты уменьшаются при повышении температуры [47, 48, 50], при замене воды органическими растворителями [47] и при протонировании [47].

Наблюдаемые явления объясняются образованием комплексов, в которых основания уложены в стопки, так что плоскость одного основания параллельна плоскости другого [47–51]. При такой конформации комплексов протоны каждого из оснований должны быть дополнительно экранированы за счет магнитной анизотропии, вызываемой токами кольца другого основания. В случае растворов пиримидиновых производных этот эффект не обнаруживается [49], но в присутствии пуриновых производных такие сдвиги сигналов протонов пиримидинов в сторону сильных полей наблюдаются. В свою очередь, пиримидиновые производные уменьшают сдвиги, вызываемые взаимодействием пуриновых оснований [49].

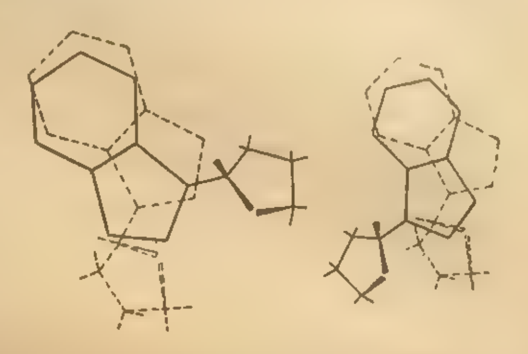


Рис. 4.5. Схематическое изображение вероятных „средних" конформаций при взаимодействии пуриновых нуклеозидов в водных растворах (пунктиром изображен нуклеозид, удаленный от наблюдателя) [38].

Из данных ЯМР можно получить некоторые сведения о конформации образующихся комплексов [38, 48, 50] (речь идет о средней конформации, поскольку энергии ассоциации имеют порядок величины kT и, следовательно, комплексы, обладающие разной конформацией, быстро превращаются друг в друга). Из табл. 4.8 видно, что $\Delta\delta$ протонов при С-2 существенно выше, чем для протонов при С-8 или С-1′ во всех исследованных соединениях. Это, очевидно, вызвано тем, что существует какой-то предпочтительный тип взаимодействия оснований с определенным положением их относительно друг друга в стопке. Наиболее вероятные конформации, объясняющие наблюдаемые различия в химических сдвигах протонов в нуклеозидах, изображены на рис. 4.5. Однако, по-видимому, существуют и другие способы взаимодействия оснований (см. [48, 50]).

5. Изменение свойств оснований, входящих в состав олигонуклеотидов, по сравнению с мономерными соединениями

Межплоскостные взаимодействия оснований еще более сильны, когда основания входят в состав олиго- и полинуклеотидов. Основным критерием таких взаимодействий в олигонуклеотидах является

отклонение оптических свойств от аддитивности, т. е. от картины, получаемой при суммировании соответствующих характеристик составляющих мономеров. Это отклонение четко прослеживается уже на простейших олигонуклеотидах — динуклеозидмонофосфатах (присутствие второй фосфатной группы оказывает незначительное влияние на оптические свойства). В этих соединениях по стерическим соображениям невозможно образование внутримолекулярной водородной связи между основаниями, и поскольку наблюдаемые эффекты не зависят от концентрации *, то нет и межмолекулярной ассоциации. Следовательно, изменение оптических свойств обусловлено внутримолекулярным взаимодействием оснований — путем образования стопки.

Гипохромный эффект. В квантовой механике взаимодействие света с веществом связано с определенным для каждого вещества вектором μ, называемым моментом перехода. Величина и направление этого вектора зависят от волновой функции состояния, в котором электрон находился до взаимодействия (основное состояние), и от волновой функции состояния, в которое электрон перешел под влиянием светового кванта (возбужденное состояние).

Поглощается только та часть света, электрический вектор которой параллелен моменту перехода. Интенсивность поглощения зависит от абсолютной величины [μ]. В классическом представлении взаимодействующую со светом молекулу можно представить в виде осциллятора, колеблющегося в направлении вектора момента перехода, и считать, что энергия поглощенного света расходуется на увеличение энергии колебаний осциллятора. Если две молекулы находятся в непосредственной близости друг от друга, причем их положения фиксированы, то за счет взаимодействия моментов перехода (или в классическом представлении — осцилляторов) оптические свойства каждой из этих молекул должны измениться (см., например,[52–54]). Это проявляется прежде всего в изменении интенсивности поглощения и смещении максимума адсорбции, которые зависят от взаимного расположения осцилляторов. В частности, при расположении осцилляторов друг под другом при определенной величине угла φ между ними интенсивность поглощения в длинноволновой области должна уменьшаться **.

Уменьшение интенсивности поглощения можно характеризовать с помощью так называемой процентной гипохромии h, определяемой формулой[56]

$$h = \left(1 - \frac{\varepsilon_д(\lambda)}{\varepsilon_м(\lambda)}\right) 100 \qquad (1)$$

* Независимость от концентрации наблюдается в интервале концентраций $10^{-4} - 10^{-5}$ *моль/л*, используемых для оптических определений. При более высоких концентрациях порядка ($10^{-3} - 10^{-1}$ *моль/л*), которые применяются для исследований методом ЯМР, наблюдается ассоциация олигонуклеотидов[318, 319].

** Подробнее см. в сборнике «Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот», под ред. Лазуркина Ю. С., Изд. «Наука», 1967, стр. 113.

где $\varepsilon_д(\lambda)$ и $\varepsilon_м(\lambda)$ — мольные коэффициенты экстинкции динуклеозидмонофосфата и эквимольной смеси входящих в его состав мономеров.

Длину волны λ обычно выбирают соответствующей максимуму поглощения динуклеозидмонофосфата. Другой величиной, с помощью которой характеризуют уменьшение интенсивности поглощения, является процентный гипохромизм H, определяемый[56] формулой

$$H = \left(1 - \frac{f_д}{f_м}\right) 100 \qquad (2)$$

Здесь $f_д$ и $f_м$ — так называемые силы осцилляторов, которые непосредственно связаны с величиной момента перехода μ и могут быть вычислены теоретически или определены экспериментально из площади пика поглощения, соответствующего данному электронному переходу в спектре, по формуле

$$f = 4{,}32 \cdot 10^{-2} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{\varepsilon(\lambda)}{\lambda^2}\, d\lambda \qquad (3)$$

где λ_1 — длина волны минимума поглощения в коротковолновой области; λ_2 — длина волны в длинноволновой области, при которой $\varepsilon(\lambda)$ становится равной нулю.

Гипохромные эффекты в динуклеозидмонофосфатах различного состава хорошо известны[55–62]. В табл. 4.9 в качестве примера приводятся процентная гипохромия и процентный гипохромизм всех 16 возможных обычных динуклеозидмонофосфатов при трех значениях pH[56]. Видно, что во всех случаях наблюдается заметное понижение адсорбции УФ-света по сравнению с составляющими мономерами. Если оба основания в динуклеозидфосфате при данном pH заряжены одинаково, можно ожидать, что взаимодействия между ними не будет из-за отталкивания одноименных зарядов. И действительно, в большинстве случаев, наблюдается уменьшение гипохромных эффектов при протонировании или депротонировании обоих оснований в динуклеозидмонофосфате, хотя имеются и не совсем понятные исключения, когда гипохромия при этом возрастает (UpU и GpU при pH 7 и 11,5 соответственно).

При повышении температуры оптическая плотность увеличивается и поглощение динуклеозидфосфатов становится равным или по крайней мере близким суммарному поглощению смеси компонентов той же концентрации[55, 57, 60, 61]. Это также означает, что между основаниями в динуклеозидфосфатах существует определенное взаимодействие.

Наличие гипохромного эффекта свидетельствует о взаимодействии оснований, однако его отсутствие еще не означает, что взаи-

модействия нет, и попытки ряда авторов по величине гипохромного эффекта разделить основания на способные и неспособные к межплоскостному взаимодействию[56, 59] мало обоснованы. Это относится также к данным, полученным с помощью измерения дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма (см. ниже).

Таблица 4.9. **Процентный гипохромизм *H* и процентная гипохромия *h* динуклеозидмонофосфатов* при различных pH (25° C, ионная сила 0,1)**[56]

Соединение	*H*, %	*h*, %	*H*, %	*h*, %	*H*, %	*h*, %
	при pH 1		при pH 7		при pH 11,5	
GpC	(6,8)	(10,7)	7,2	8,7	4,4	6,0
CpG	(6,8)	(9,8)	6,2	3,2	5,4	9,2
UpG	6,5	5,6	7,6	5,3	(3,0)	(4,2)
GpU	4,9	6,2	−1,2	2,4	(0)	(4,3)
UpA	3,0	3,3	1,4	3,0	1,7	1,5
ApU	2,7	3,0	1,6	5,0	0	3,8
GpA	(2,7)	(3,7)	6,0	7,6	2,9	5,8
ApG	(1,4)	(3,0)	2,6	5,8	1,3	4,0
CpU	1,5	2,7	4,2	6,3	4,2	4,0
UpC	—0,3	3,2	0,7	2,4	1,2	1,8
ApC	(0)	(1,8)	7,3	7,6	9,7	9,0
CpA	(−2,3)	(−1,0)	5,2	7,8	6,3	6,5
ApA	(−0,5)	(0,3)	6,8	9,4	7,4	9,4
CpC	(−5,5)	(0,1)	4,9	7,2	5,7	7,2
GpG	(−1,0)	(0,5)	9,1	6,9	(4,4)	(−0,8)
UpU	−2,0	3,0	−3,6	1,7	(0,8)	(2,5)

* В скобки взяты величины для соединений, в которых оба основания при данном значении pH заряжены.

Обращает на себя внимание различная величина гипохромных эффектов изомерных динуклеозидфосфатов. Возможно, что в данном случае взаимное расположение оснований в стопке для двух изомеров различно.

Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм. Еще более заметны изменения свойств оснований в составе олигонуклеотидов (по сравнению с мономерными компонентами) при сопоставлении кривых дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма в ультрафиолетовой области.

Бо́льшая часть доступных в настоящее время данных относится к динуклеозидмонофосфатам и тринуклеозиддифосфатам. Показано, что наличие концевой фосфатной группы в положении 5′ мало

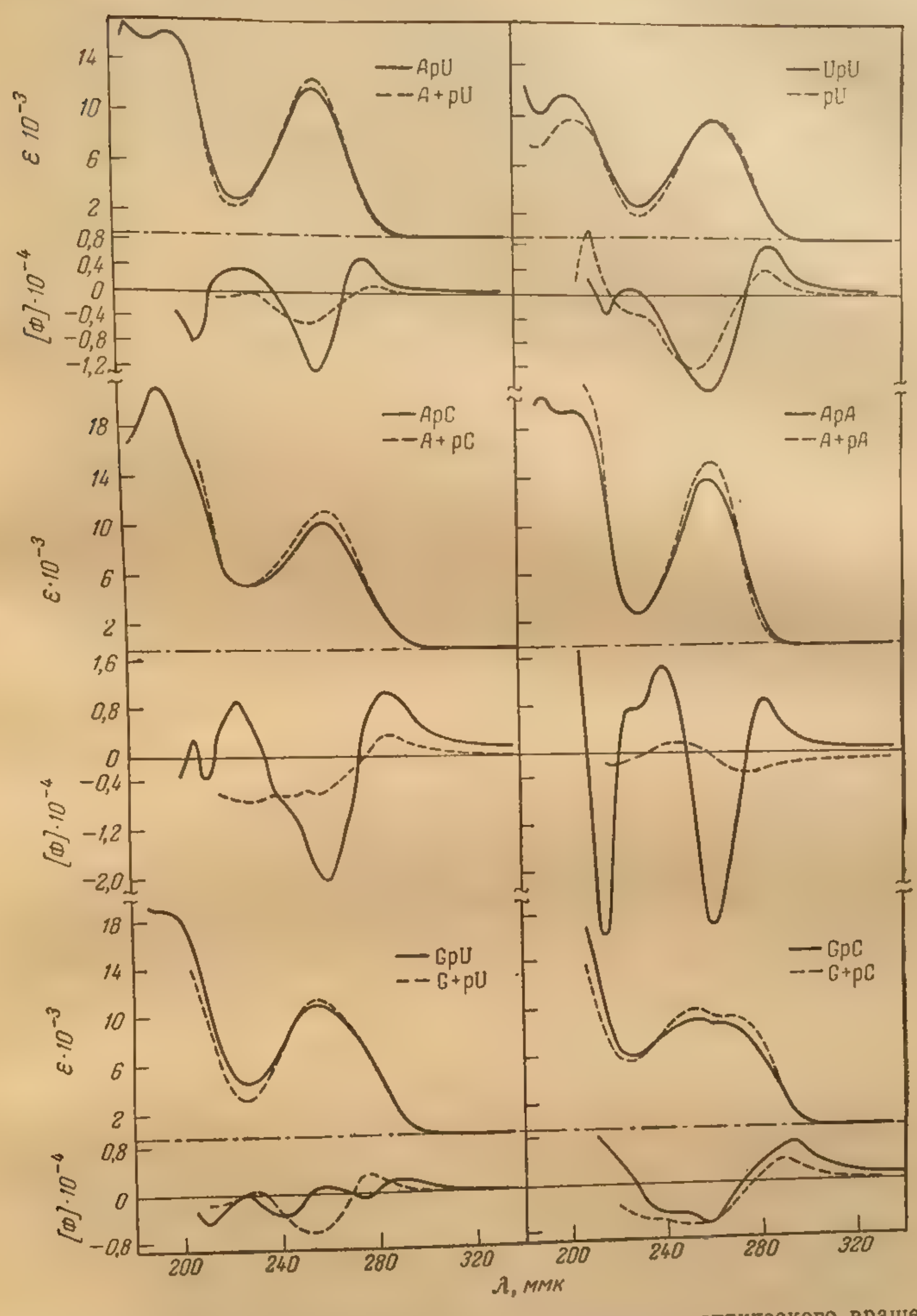


Рис. 4.6. Кривые оптической плотности и дисперсии оптического вращения ряда динуклеозидмонофосфатов и их мономерных составляющих при нейтральных значениях pH [236].

сказывается на спектре кругового дихроизма и стабильности ассоциации в динуклеозидмонофосфатах [327, 340], в то время как 3'-концевая фосфатная группа существенно влияет и на спектр кругового дихроизма [327, 319] и на дисперсию оптического вращения [329] динуклеозидмонофосфатов, заметно ослабляя взаимодействие оснований в них [327].

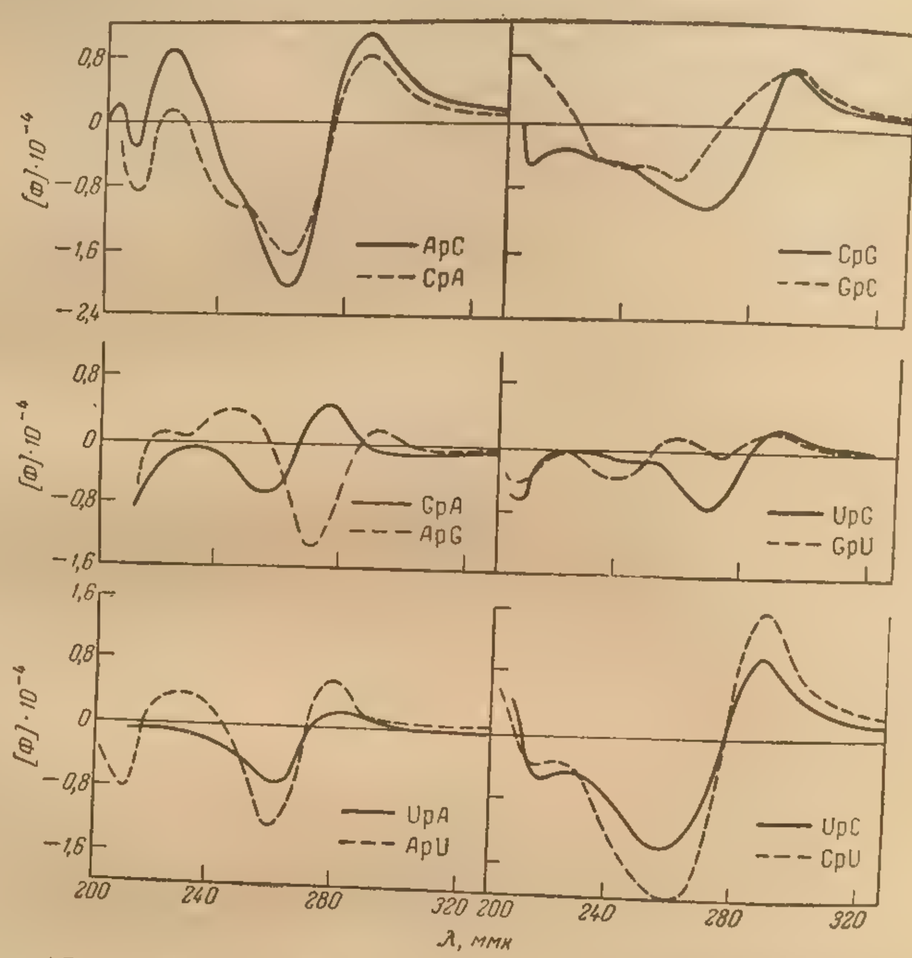


Рис. 4.7. Кривые дисперсии оптического вращения изомерных динуклеозидмонофосфатов при нейтральных значениях pH [56].

На рис. 4.6 приводятся кривые оптической плотности и дисперсии оптического вращения для некоторых динуклеозидмонофосфатов в сопоставлении с дисперсией оптического вращения суммы компонентов [56]. Легко видеть, что эти кривые различаются как интенсивностью вращения, так и своей формой. По форме кривой отличаются друг от друга также изомеры с разной последовательностью оснований (рис. 4.7). Эти эффекты не зависят от концентрации. С повышением температуры кривая дисперсии оптического вращения олигонуклеотида приближается к кривой дисперсии оп-

тического вращения[56, 61] суммы мономеров. Подобные эффекты наблюдаются и для тринуклеозиддифосфатов, где также вряд ли возможно образование внутримолекулярной водородной связи[63–66]. Как и в случае гипохромного эффекта, можно ожидать, что дисперсия оптического вращения будет меняться с изменением pH, приближаясь к дисперсии суммы мономеров, когда оба основания в динуклеозидфосфате заряжены.

За меру отклонения дисперсии оптического вращения динуклеозидфосфата от аддитивности можно принять абсолютную величину максимальной разницы $[\Phi_д - \sum \Phi_м]$ вращения динуклеозидфосфата и суммы мономеров, которая определяется путем построения зависимости $[\Phi_д - \sum \Phi_м]$ от длины волны λ. Из данных табл. 4.10, где приводятся величины этой разности для разных динуклеозидмонофосфатов при трех различных значениях pH, можно заключить, что такой эффект действительно наблюдается. Таким образом, дисперсия оптического вращения также показывает, что между основаниями в динуклеотидах существует определенное взаимодействие.

Из данных по дисперсии оптического вращения можно сделать определенные выводы относительно взаимной ориентации

Таблица 4.10. **Значения $[\Phi_д - \Sigma\Phi_м]$ динуклеозидмонофосфатов при различных pH (25° С, ионная сила 0,1)[56]**

Соединение	$[\Phi_д - \Sigma\Phi_м]\cdot 10^{-4}$ при pH 1	λ, *ммк*	$[\Phi_д - \Sigma\Phi_м]\cdot 10^{-4}$ при pH 7	λ, *ммк*	$[\Phi_д - \Sigma\Phi_м]\cdot 10^{-4}$ при pH 11,5	λ, *ммк*
GpC	(1,1) *	265	0,38	293	0,31	276
CpG	(0,30)	265	0,68	273	0,59	273
UpG	0,32	257	0,90	273	0,16	270; 250
GpU	1,62	257	0,74	255	0,17	251
UpA	0,23	263	0,32	267	0,03	262
ApU	0,18	262	0,80	261	0,37	262
GpA	(0,31)	275	0,76	277	0,16	265
ApG	(0,45)	273	1,08	270	0,75	258
CpU	0,70	272	1,22	265	0,78	267
UpC	0,49	275	0,57	267	0,22	270
ApC	(0,28)	270	1,52	265	1,33	264
CpA	(0,11)	270	1,11	263	1,11	265
ApA	(0,36)	257	2,86	260	2,72	260
CpC	(0,43)	280	1,61	272	1,57	271
GpG	(0,58)	253	0,66	249	(0)	—
UpU	0,67	263	0,67	264	(0,19)	240

* В скобки взяты величины для соединений, в которых оба основания при данном значении pH заряжены.

16 Зак. 614

оснований в динуклеозидфосфатах. Теоретические расчеты эффекта дисперсии оптического вращения [67], выполненные в предположении, что основания в динуклеозидфосфате образуют правовращающую спираль с углом поворота $\gamma \approx 36°$, как это изображено на рис. 4.8, дают качественно верную картину дисперсии, тогда как левовращающая спираль дает противоположный знак эффекта Коттона.

Рис. 4.8. Схематическое изображение возможного расположения оснований в олигонуклеотиде (показан тринуклеотидный фрагмент), вытекающее из сопоставления расчетных и экспериментальных данных дисперсии оптического вращения. Правовращающая спираль ($\gamma > 0$) [67].

Аналогичную информацию дают спектры кругового дихроизма [68–71]. На рис. 4.9 приведены спектры кругового дихроизма некоторых динуклеозидмонофосфатов в сопоставлении со спектрами соответствующих мономерных единиц (нуклеозидов или нуклеотидов). Наблюдаемая разница практически исчезает при повышении температуры. Из данных кругового дихроизма, сопоставленных с теоретическими расчетами, также следует, что угол поворота γ должен быть положительным и иметь величину [71] между 30 и 45°.

Наконец, в последнее время стали доступны спектры ЯМР некоторых олигонуклеотидов [61, 72–75, 318–322]. Из этих данных также следует, что между основаниями в динуклеозидфосфатах существует межплоскостное взаимодействие. Такое взаимодействие, например, ярко проявляется в спектре ЯМР аденилиладенозинциклофосфата (рис. 4.10). При 5° С наблюдаются четыре сигнала от протонов динуклеотида, что свидетельствует о неравноценном расположении оснований в комплексе. Кроме того, сигналы сдвинуты в сторону сильных полей по сравнению с адениловой кислотой, что должно наблюдаться при образовании межплоскостного комплекса. При повышении температур до 67° С в спектре остаются два сигнала, которые сдвинуты в сторону слабых полей, что говорит о нарушении взаимодействия между основаниями.

6. Термодинамические характеристики взаимодействия между основаниями в динуклеозидфосфатах

Из данных ЯМР так же, как и из данных по дисперсии оптического вращения и круговому дихроизму (см. стр. 238), следует, что при наличии взаимодействия оснований в олигонуклеотиде этот

олигонуклеотид существует преимущественно в конформации правовинтовой спирали, нуклеозидные звенья которой находятся в *анти*-конфигурации [318–322]. Взаимное расположение, а следовательно, и сила взаимодействия между составляющими олигонуклеотид основаниями определяется целым рядом факторов.

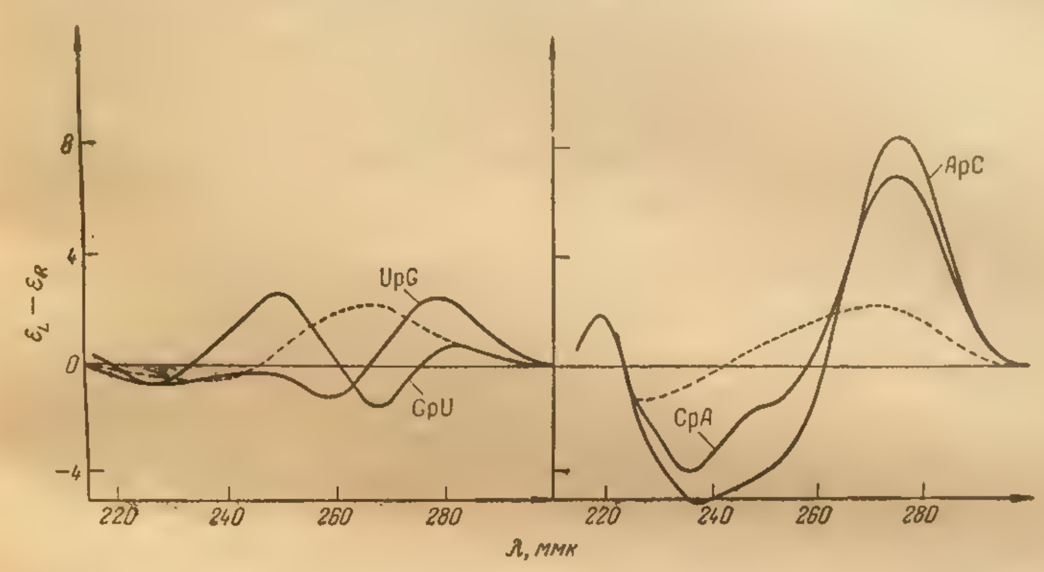


Рис. 4.9. Спектры кругового дихроизма ряда динуклеозидмонофосфатов (сплошные кривые) и составляющих их мономерных единиц (пунктирные кривые); 20° С, pH 7,0 [69].

Кривые дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма дидезоксирибонуклеозидфосфатов и диарабинонуклеозидфосфатов меньше отличаются от рассчитанных для суммы компонентов и мало меняются с температурой [68, 323–326] по сравнению с рибопроизводными. Спектры кругового дихроизма смешанных динуклеозидфосфатов, содержащих рибозильные и дезоксирибозильные или арабинозильные звенья, изменяются в зависимости от последовательности этих звеньев. Если остаток дезоксирибозы или арабинозы принимает участие в образовании фосфодиэфирной связи за счет гидроксильной группы при С-3′, то спектр кругового дихроизма такого динуклеозидфосфата не отличается от спектра смеси составляющих компонентов [324, 325, 327]. Если же остаток дезоксирибозы или арабинозы участвует в фосфодиэфирной связи за счет гидроксильной группы при С-5′, то спектр кругового дихроизма этого динуклеозидфосфата практически совпадает со спектром аналогичного дирибонуклеозидфосфата [324, 325, 327].

Спектры кругового дихроизма олигонуклеотидов с 2′,5′-фосфодиэфирной связью мало отличаются от спектров суммы мономерных компонентов и лишь незначительно меняются с температурой, как показано [327] на примере цитидилил-(2′→5′)-цитидина.

Эти данные могут свидетельствовать либо об отсутствии взаимодействия между основаниями в динуклеозидфосфатах, либо о специфическом взаимном расположении их моментов перехода. Однако спектры ЯМР аденилил-(2′→5′)-цитидина [318] свидетельствуют о значительном перекрывании плоскостей оснований, даже более выраженном, чем в случае цитидилил-(3′→5′)-аденозина. Можно поэтому полагать, что отсутствие эффекта взаимодействия в спектрах кругового дихроизма является следствием специфического взаимного расположения составляющих оснований, а не отсутствия взаимодействия [318].

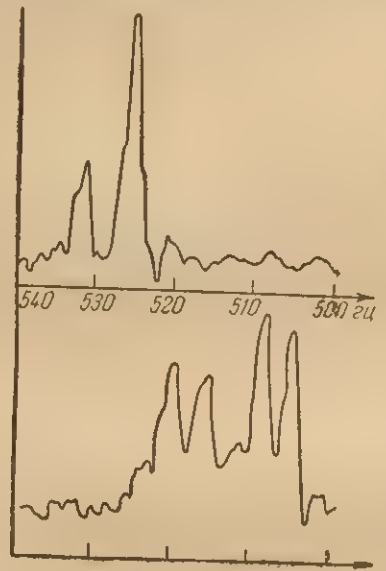


Рис. 4.10. Спектры ЯМР ApA > p в D_2O при температуре 5 (нижняя кривая) и 67° С (верхняя кривая). Ионная сила 0,1 pD 7,1 [74]. Величины химических сдвигов даны в *гц* относительно сигнала ТМС.

Выше (см. стр. 240) уже отмечалось, что изомерные динуклеозидфосфаты различаются по дисперсии оптического вращения и круговому дихроизму. Спектры ЯМР дают основания полагать [318], что в ApU остаток урацила перекрывается с шестичленным циклом остатка аденина, тогда как в UpA такое перекрывание происходит с пятичленным циклом остатка аденина. Этот вывод согласуется с данными по титрованию указанных изомеров кислотами и щелочами [78]. Определенные в этом случае константы ассоциации для UpA и ApU оказались равными соответственно 0,05 и 0,41.

На основании имеющихся данных довольно трудно определить, какие из оснований более, а какие менее способны к ассоциации. Тем не менее из данных по дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма [69] был сделан вывод о меньшей (в сравнении с другими основаниями) склонности к ассоциации урацила. Это подтверждается величинами констант ассоциации, полученными методом титрования (при 20° С; pH 7,0; 0,1 *M* NaCl) [78]:

UpU	0,00
UpA	0,05
ApU	0,41
ApA	5,38

Данное заключение также, кажется, согласуется с данными ЯМР [318], показывающими, что в UpG остаток урацила перекрывается остатком гуанина в меньшей степени, чем остатки цитозина и гуанина в составе CpG.

Исходя из спектров кругового дихроизма, был сделан, кроме того, вывод о малой способности к ассоциации гуанина [328]. Однако

данные ЯМР позволяют считать, что перекрывание остатков оснований в ApG и GpC больше, чем в ApA и ApC соответственно.

Были предприняты попытки количественного определения термодинамических параметров ассоциации оснований в составе олигонуклеотидов. Если принять, что возможны только два состояния динуклеозидфосфатов — с взаимодействующими и невзаимодействующими основаниями, — то можно на основании температурной зависимости каких-либо характеристик взаимодействия и при условии знания этих характеристик для предельных состояний определить термодинамические параметры перехода:

$$\text{Взаимодействующие основания} \rightleftarrows \text{Невзаимодействующие основания}$$

Такие определения были выполнены для ряда динуклеозидмонофосфатов на основе изменений дисперсии оптического вращения [61, 62, 77], кругового дихроизма [68, 69, 70, 71, 327, 328], оптической плотности [57, 60] и, наконец, изменений сигналов ЯМР [74] с температурой.

Таблица 4.11. **Термодинамические параметры перехода взаимодействующие основания ⇄ невзаимодействующие основания по данным различных методов**

Измерения дисперсии оптического вращения проводились при pH 7, 25,2% LiCl [61]; определения кругового дихроизма — при pH 7,5, 4,7 *M* KF, 0,01 *M* трис-буфер [69]

Соединение	По данным дисперсии оптического вращения		По данным циркулярного дихроизма		T_m*, °C
	Δ*H*°, *ккал/моль*	Δ*S*°, э. е.	Δ*H*°, *ккал/моль*	Δ*S*°, э. е.	
ApA	5,3	20	8	2,8	25
ApG	4,8	18	—	—	—
ApC	6,2	22	6,1	21	25
ApU	8,4	32	6,7	24	11
GpA	5,6	20	6,1	22	9
GpC	7,8	28	—	—	—
GpU	6,8	25	—	—	—
CpA	7,3	27	7,0	24	15
CpC	6,9	25	7,5	25	24
CpU	7,8	28	6,8	24	6
UpA	5,1	21	—	—	—
UpG	6,0	23	—	—	—
UpC	6,2	22	—	—	—
UpU	7,8	29	—	—	—

* T_m — так называемая температура плавления перехода, при которой концентрации соединений с взаимодействующими и невзаимодействующими основаниями равны (определялась по данным кругового дихроизма).

В табл. 4.11 приводятся найденные с помощью методов дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма значения ряда термодинамических параметров перехода для динуклеозидмонофосфатов. Из табличных данных следует, что эти два метода приводят к довольно различным значениям термодинамических параметров; величины, получаемые для разных пар внутри каждого метода, довольно близки. Еще более отчетливо это проявляется при сравнении констант, например, для ApA, полученных с помощью двух данных и других методов (табл. 4.12).

Таблица 4.12. **Величины энтальпии денатурации ApA по данным различных методов**

Метод	ΔH, *ккал/моль*	Литература
Дисперсия оптического вращения	5,3	*61*
УФ-Спектроскопия	6,5	*77*
	8,5	*61*
	9,4	*60*
	10	*57*
Круговой дихроизм	8	*69*
ЯМР (для ApA > p)	8,2	*74*

Значительные расхождения в величинах термодинамических констант перехода, по данным различных методов, могут быть вызваны двумя причинами. Во-первых, могут быть неверно найдены предельные значения, характеризующие полностью взаимодействующую и полностью невзаимодействующую молекулы. Во-вторых, гипотеза о существовании только двух состояний может быть неверна, и имеется целый ряд промежуточных состояний между полностью ассоциированной и полностью диссоциированной формами.

Вне всякого сомнения, предельные значения устанавливаются существующими методами чрезвычайно неточно; тем не менее, поскольку различия величин, характеризующих ассоциацию, столь велики, есть основания считать, что вторая причина [61] может быть основательнее. Были сделаны попытки разработать модель со многими состояниями [79, 61], однако полученные при этом результаты также неадекватно объясняют экспериментально наблюдаемые величины.

Подводя итог приведенному выше экспериментальному материалу по взаимодействию оснований в водной среде, надо еще раз отметить следующие основные выводы:

1. В водных растворах свободные основания, нуклеозиды и нуклеотиды, а также основания, входящие в состав олигонуклеотидов, способны к ассоциации с образованием комплексов, в которых пло-

скость одного основания расположена параллельно плоскости другого.

2. Взаимодействие такого рода выражено сильнее в случае олигонуклеотидов.

3. Из данных по мономерным компонентам следует, что пуриновые основания ассоциируют сильнее, чем пиримидиновые; с этим согласуются и данные по динуклеозидмонофосфатам. Урацильное ядро взаимодействует слабее остальных.

4. Образующиеся ассоциаты ассиметричны, причем в случае олигонуклеотидов взаимное расположение плоскостей соседних оснований зависит от их последовательности.

5. Указанные ассоциаты разрушаются органическими растворителями, повышением температуры и изменением кислотности среды.

7. Природа сил, стабилизующих ассоциаты оснований в водном растворе

Стабильность ассоциатов в растворах, очевидно, определяется двумя факторами, а именно: силами взаимодействия оснований друг с другом и эффектами, связанными с взаимодействием растворителя со свободными и ассоциированными основаниями.

Взаимодействие оснований друг с другом в основном обусловлено, по-видимому, ван-дер-ваальсово-лондоновскими силами (см. стр. 227).

Сопоставление расчетных[80] данных с экспериментальными данными по ΔH^0 оснований (см. табл. 4.7) показывает, что при расчете получаются довольно сильно завышенные результаты, хотя и правильно предсказывается увеличение ассоциации 6-метилпурина по сравнению с пурином. К сожалению, возможно сопоставление только этих двух соединений, остальные определения энтальпии проведены на нуклеозидах, тогда как расчеты выполнены для оснований. Эти расчеты дают значения свободной энергии без учета энтропийного фактора; они несопоставимы с приводимыми ранее величинами констант ассоциации, поскольку энтропийные изменения при гомоассоциации разных оснований могут быть различными (см. табл. 4.7).

Тем не менее обращает на себя внимание большая разница энергий взаимодействия урацила и цитозина при гомоассоциации и при ассоциации с пурином. Это, возможно, объясняет экспериментально наблюдаемое различие в свойствах соответствующих динуклеозидмонофосфатов. Следует отметить, однако, что экспериментально определяемые величины энтальпии гомоассоциации уридина и цитидина близки между собой (см. табл. 4.7).

Теория влияния растворителя на ассоциацию оснований нуклеиновых кислот разработана в настоящее время далеко не во всех

деталях. Наиболее подробные исследования в этом направлении проведены Синаноглу и др.[81, 82]. Аналогичные расчеты, хотя и отличающиеся в деталях, проведены также Пюльманом[80]. Здесь приводится обсуждение по схеме, данной в последней работе. Рассматриваются два эффекта, связанные с влиянием растворителя. Во-первых, это различные для ассоциированных и свободных молекул эффекты электростатического взаимодействия, приводящие к изменению свободной энергии при ассоциации $\Delta F_р$. Величину $\Delta F_р$ мы будем в дальнейшем называть электростатическим изменением свободной энергии. Во-вторых, рассматривается изменение поверхности соприкосновения растворенного вещества с растворителем при переходе от диссоциированных к ассоциированным молекулам, что приводит к изменению свободной энергии $\Delta F_п$; эту величину мы будем называть изменением поверхностной свободной энергии.

Фактор $\Delta F_р$. За счет электростатических взаимодействий с растворителем стабилизуется состояние, характеризующееся большим дипольным моментом и меньшими размерами. Это приводит к большей стабилизации раздельных молекул по сравнению с комплексом, поскольку комплекс больше по размеру и обладает меньшим дипольным моментом из-за компенсации дипольных моментов компонентов в положении, соответствующем минимуму энергии. Поэтому $\Delta F_р > 0$, т. е. такое взаимодействие приводит к невыгодности комплексообразования. При этом $\Delta F_р$ пары цитозин + цитозин $> \Delta F_р$ пары урацил + урацил $> \Delta F_р$ пары пурин + + пурин. Величина $\Delta F_р$ относительно мала по сравнению с $\Delta F_п$.

Фактор $\Delta F_п$. Изменение свободной энергии в связи с изменением поверхности взаимодействия растворенного вещества с растворителем, в свою очередь, может быть рассмотрено как состоящее из двух частей. Во-первых, здесь вносит вклад изменение энергии поверхностного натяжения:

$$\Delta F'_п = \gamma \, \Delta A$$

где γ — поверхностное натяжение; ΔA — изменение поверхности при переходе от комплекса к несвязанным молекулам.

Во-вторых, в выражение $\Delta F_п$ входит составляющая $\Delta F''_п$, характеризующая изменение числа упорядоченных молекул растворителя вокруг растворенного вещества при ассоциации:

$$\Delta F''_п = -T \, \Delta S''_п$$

где T — абсолютная температура; $\Delta S''_п$ — изменение энтропии растворителя при переходе из объема в поверхностный слой.

Величина $\Delta F''_п$ мала по сравнению с $\Delta F'_п$; оба эти изменения энергии приводят к стабилизации комплекса по сравнению с диссоциированными молекулами.

Можно провести оценку величин изменения свободной энергии при образовании ассоциатов Pu + Pu и Py + Py, если принять, что неассоциированные основания образуют в растворителе полость цилиндрической формы с площадью основания 30 Å^2 для Py и 50 Å^2 для Pu. Тогда разность в величине поверхности между свободными основаниями и комплексом будет определяться разностью поверхностей, которая в случае пиримидинов равна 2×30 Å^2, а в случае пуринов 2×50 Å^2. Величина $\Delta F_п$ (равная сумме факторов $\Delta F'_п$ и $\Delta F''_п$) для пуринов равна ~ 14 *ккал/моль*, а для пиримидинов $\sim 8{,}4$ *ккал/моль*. Это означает, что пурины должны быть более склонны к ассоциации, чем пиримидины. Такой подход к влиянию растворителя дает ответ на вопрос, почему органические растворители, поверхностная энергия которых меньше, чем у воды, оказывают дестабилизирующее влияние на межплоскостные взаимодействия, а также позволяет понять закономерности влияния растворителя на некоторые химические реакции, в частности на процесс фотодимеризации тимина[83] (см. гл. 12).

Результаты теоретических расчетов, проведенных для оценки ван-дер-ваальсово-лондоновских сил и влияния растворителя в процессе ассоциации оснований, можно рассматривать лишь как сугубо качественные. Тем не менее они полезны для понимания относительной роли различных факторов, приводящих к возникновению вторичной структуры нуклеиновых кислот.

Рассмотренные два типа взаимодействия оснований: поперечные (путем образования водородных связей со стабилизацией за счет ван-дер-ваальсово-лондоновских сил) и межплоскостные взаимодействия — определяют стабильность и специфичность структуры нуклеиновых кислот. В определенных случаях имеют место оба типа взаимодействия (как, например, в ДНК или РНК), в других реализуются только межплоскостные взаимодействия (в односпиральных гомополинуклеотидах). Далее будут рассмотрены конкретные черты вторичной и третичной структур полинуклеотидов.

IV. ИССЛЕДОВАНИЕ МАКРОСТРУКТУРЫ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ ДНК

Одним из краеугольных камней современной молекулярной биологии является гипотеза Уотсона и Крика[1], выдвинутая ими в 1953 г. Эта гипотеза обобщила имевшиеся к тому времени данные о структуре и функциях ДНК и стимулировала развитие качественно новых подходов к изучению химии, физики и функциональной роли нуклеиновых кислот. В частности, вытекающий из гипотезы Уотсона и Крика[1] принцип комплементарности был использован для объяснения механизмов передачи генетической информации как при воспроизведении генов, так и при биосинтезе белка. В дальнейшем эти механизмы нашли экспериментальное

подтверждение в работах Корнберга по матричному синтезу ДНК, Берга — по матричному синтезу РНК на ДНК и в работах Ниренберга и Кораны по коду белкового синтеза.

1. Гипотеза Уотсона и Крика

К моменту выдвижения гипотезы Уотсона и Крика[1, 84] существовало несколько вариантов описания структуры ДНК, однако ни один из них не мог объяснить ряд фундаментальных проблем. Наиболее важной из них был вопрос о том, каким образом обладающие разными размерами основания, в определенном, но неповторяющемся порядке расположенные вдоль полинуклеотидной цепи, могут давать высокосимметричную картину дифракции рентгеновских лучей.

Выдвижение гипотезы Уотсона и Крика стало возможным благодаря накоплению фактов, касающихся химического строения и нуклеотидного состава ДНК. Когда обсуждают эту проблему, обычно в качестве основного фактора, способствовавшего возникновению гипотезы, называют открытые Чаргаффом закономерности (см. стр. 59) в нуклеотидном составе различных ДНК, из которых следовало, что отношения аденин : тимин и гуанин : цитозин для всех исследованных к тому времени молекул примерно равны 1. Указывают также на имевшиеся тогда рентгеноструктурные данные, из которых можно было сделать вывод, что ДНК имеет спиральное и высокосимметричное строение. Здесь следует отметить, что основным подходом Уотсона и Крика при выяснении структуры ДНК было построение стереохимических моделей, не противоречащих имевшимся экспериментальным данным. Такое построение было бы невозможно, если бы к этому моменту не были получены данные о 3′,5′-характере фосфодиэфирной связи, соединяющей отдельные нуклеотидные звенья[85, 86], о неразветвленности полинуклеотидной цепи, о фуранозной форме дезоксирибозы[87] и о β-конфигурации N-гликозидной связи[88]. Кроме того, имелись сведения (из данных рентгеноструктурного анализа) по структуре гетероциклических оснований аденина, гуанина[89–91] и цитозина[92], а также по конформации фуранозного кольца[92] и по стереохимии N-гликозидной связи[93].

Используя всю эту совокупность фактов, и удалось построить адекватную модель ДНК.

Первая модель ДНК была построена для одной из двух известных в то время форм ДНК (см. ниже) — формы В, поскольку из рентгеноструктурных данных, относящихся к ней, можно было извлечь больше информации о геометрии молекулы. Такой анализ различных препаратов ДНК дал возможность сделать следующие выводы:

1. Структура ДНК может быть представлена в виде высокосимметричной спирали.

2. Параметры этой спирали не зависят от состава ДНК; радиус спирали 10—12 Å, период идентичности 34 Å и расстояние между основаниями, плоскости которых перпендикулярны оси спирали, 3,4 Å, так что на период идентичности в одной цепи приходится 10 оснований.

3. В сочетании с данными по плотности препаратов ДНК следует принять, что в молекуле ДНК содержатся две полинуклеотидные цепочки.

Следовательно, модель структуры должна быть такой, чтобы вне зависимости от нуклеотидного состава и порядка чередования нуклеотидных звеньев вдоль цепи получалась одна и та же спираль. Это возможно лишь в том случае, если мономерные единицы двойной спирали одинаковы по размерам и симметрии. Отвлекаясь на время от вопроса о том, каким образом различные по размерам основания могут образовывать одинаковые по размерам мономерные звенья в двойной спирали, следует попытаться построить модель двойной спирали с одинаковыми мономерными единицами с тем, чтобы выяснить возможные расположения фосфатно-углеводного остова молекулы. Построение такой стереохимической модели, удовлетворяющей рентгеноструктурным данным и принципу соблюдения ван-дер-ваальсовых радиусов, позволило сделать вывод, что фосфатные группы должны быть расположены на внешней стороне спирали, а основания — внутри.

Другой вопрос, связанный со структурой ДНК, заключается в следующем: соответствует ли периоду идентичности полный виток спирали или его половина. Второй вариант возможен, если двойная спираль ДНК имеет ось симметрии второго порядка, параллельную оси спирали. В первом случае (для того, чтобы на период идентичности приходилось 10 нуклеотидов) угол между направлением N-гликозидных связей соседних оснований в одной цепи должен быть равным 36°, во втором случае — 18°. Построение стереохимической модели одной из цепей дало возможность сделать выбор в пользу первого варианта — соответствие периода идентичности полному витку спирали, — поскольку во втором случае невозможно построить модель без нарушения ван-дер-ваальсовых радиусов.

Таким образом, не выдвигая конкретных соображений по поводу структуры мономерных единиц, удалось ответить на два существенных вопроса: о расположении фосфатных групп и о соответствии одного витка спирали ее периоду идентичности.

Следующим шагом в построении модели является гипотеза о силах, удерживающих вместе две полинуклеотидные цепочки ДНК. Уотсон и Крик высказали предположение, что это является следствием образования водородных связей между основаниями,

которые, как уже было ясно, расположены внутри двойной спирали. Отсюда сразу вытекало два необходимых следствия:

1. Связи должны образовываться между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, поскольку именно от таких пар можно ожидать близких размеров для разных оснований; пары Pu + Pu и Py + Py сильно отличались бы друг от друга.

2. В соответствии с правилом Чаргаффа пары должны образоваться только между гуанином и цитозином и аденином и урацилом.

Для того чтобы удовлетворять требованию высокой симметричности спирали, пары должны отвечать следующим требованиям:

1. Необходимо, чтобы расстояние между гликозидными связями оснований, образующих пару, были близки для обеих пар.

2. Углы, образуемые гликозидными связями, должны быть примерно равными в обеих парах.

3. Для того чтобы обеспечить эквивалентность всех углеводных и фосфатных групп в двойной спирали, полинуклеотидная цепочка должна обладать осью симметрии второго порядка, перпендикулярной оси спирали. В соответствии с этим N-гликозидные связи также имеют ось симметрии второго порядка. На основании рентгеноструктурных данных относительно размеров оснований и их конформации, а также предположения о кето-аминотаутомерных формах оснований были построены модели пар оснований в составе полинуклеотида (рис. 4.11), и оказалось, что они удовлетворяют всем перечисленным выше требованиям.

Наконец, последний вопрос — о типе спирали (правовращающая или левовращающая) был также решен путем построения стереохимической модели, в которой основания образовывали комплементарные пары аденин·урацил и гуанин·цитозин. При этом использовались данные по конформации дезоксирибозы, длине и расположению N-гликозидной связи и длине и углах связей P—O при тетраэдрической конфигурации атома фосфора. Как оказалось, спираль должна быть правовращающей, поскольку построение левовращающей модели без нарушения ван-дер-ваальсовых радиусов затруднительно (см. стр. 255). Следует еще подчеркнуть, что, если ось симметрии второго порядка перпендикулярна оси спирали, направление двух цепей, составляющих молекулу, должно быть противоположным. Следовательно, на каждом конце двухспиральной молекулы находится 3′-конец одной и 5′-конец другой односпиральных компонент. В построенной таким образом модели угол между соседними парами оснований (т. е. линиями, соединяющими атомы C-1′ остатков дезоксирибозы в комплементарных парах) составляет 36°. Основания расположены вдоль оси параллельно друг другу, и их плоскости составляют угол примерно 90° с осью спирали; плоскости дезоксирибофуранозного кольца почти параллельны оси спирали. Основания, образующие

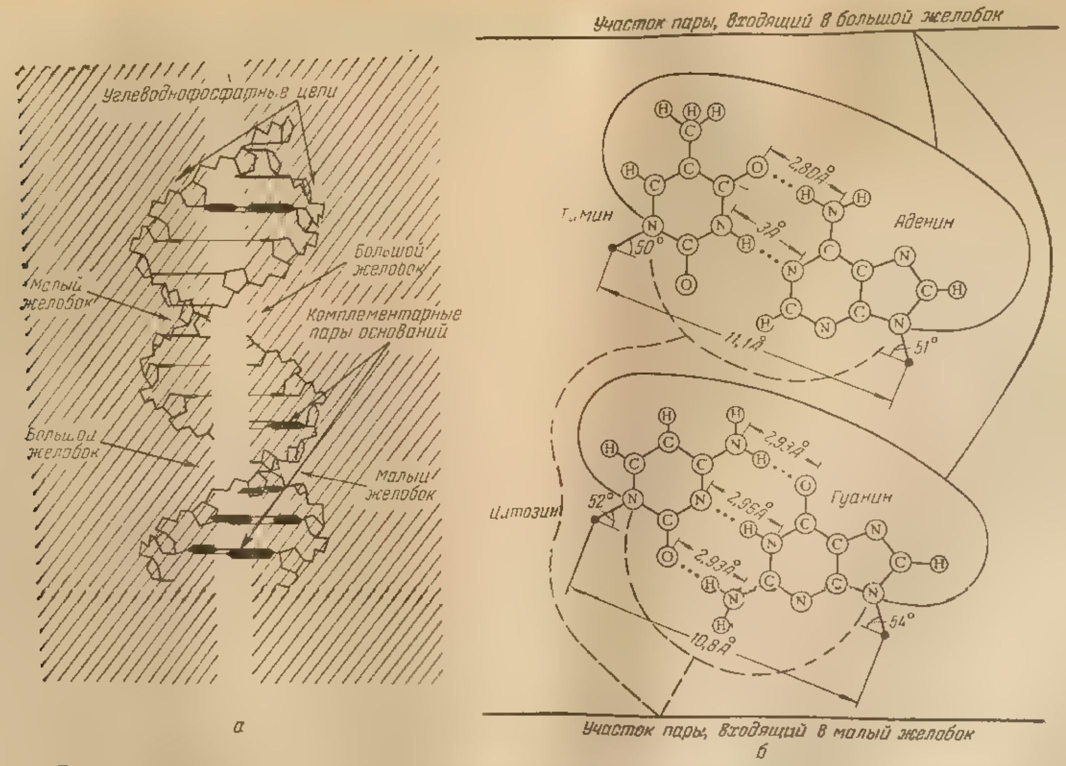


Рис. 4.11. Схематическое изображение двойной спирали ДНК[84] (*а*) и комплементарных пар оснований (*б*).

комплементарную пару, расположены в одной плоскости. Схематическое изображение полученной модели дано на рис. 4.11, *а*.

Таким образом, модель, предложенная Уотсоном и Криком, соответствовала рентгеноструктурным данным и давала структуру ДНК, позволявшую не только объяснить ее физико-химические свойства, но и выдвинуть предположение о способе удвоения ДНК в процессе репликации на основании принципа комплементарности [94]. Однако модель нуждалась в экспериментальных подтверждениях.

Прежде всего необходимо было доказать, что кето- и аминогруппы оснований действительно принимают участие в образовании водородных связей. Существуют ряд доказательств правильности этого предположения.

1. Еще до построения модели были известны данные по потенциометрическому титрованию ДНК, согласно которым титрование нативных препаратов ДНК приводит в конечном итоге к необратимым изменениям кислотно-основных свойств ДНК. Кривая обратного титрования существенно отличается от кривой прямого титрования: точки эквивалентности нативной ДНК сдвинуты в значительно более кислую область при кислотном и в значительно более щелочную область при щелочном титровании по сравнению с соответствующими точками при обратном титровании.

Это дало основание считать, что титруемые группы оснований нуклеиновых кислот принимают участие в образовании водородных связей [95].

2. В ИК-спектрах растворов в D_2O двухспиральных синтетических полирибонуклеотидов, могущих служить моделями ДНК, наблюдаются типичные для образования водородных связей сдвиги характеристических частот кето- и аминогрупп оснований [96, 97].

3. Существование водородных связей в водных растворах ДНК подтверждается также измерениями скорости изотопного обмена с дейтерием и тритием [98, 99, 341, 342]. Эти измерения показывают, что в ДНК имеется определенное число сравнительно медленно обменивающихся протонов *n*, которое зависит от содержания пар аденин · тимин и гуанин · цитозин в молекуле ДНК [341, 342].

4. В случае двухспиральной ДНК не наблюдается реакции аминогрупп оснований с формальдегидом (см. гл. 6), что свидетельствует, если не об их участии в образовании водородных связей, то по крайней мере об их сильной пространственной экранированности (в соответствии с моделью Уотсона и Крика).

Необходимо было также доказать строгую специфичность взаимодействия оснований. Доказательства этого рода были получены как на уровне мономеров (см. стр. 218), так и на уровне взаимодействия синтетических полинуклеотидов. Оказалось, что полимерные производные аденина (полинуклеотиды) взаимодействуют избирательно с производными урацила, но не цитозина, так же как

производные гуанина взаимодействуют с производными цитозина, но не урацила[100].

Кроме того, следовало доказать правильность принятых Уотсоном и Криком таутомерных форм оснований. Доказательства справедливости этого предположения также были получены на уровне мономерных единиц (см. гл. 3) и при исследовании синтетических полинуклеотидов[97]. И, наконец, правильность принятой Уотсоном и Криком (см. рис. 4.11, *а*) схемы образования водородных связей была подвержена в дальнейшем при рентгеноструктурном анализе литиевой соли В-формы ДНК[101].

Таким образом, подтвердились все основные положения гипотезы Уотсона и Крика о строении ДНК. В дальнейшем в работах Корнберга и сотр. была подтверждена также и вторая их гипотеза — о способе удвоения ДНК в биологических системах. Последующие работы по рентгеноструктурному анализу ДНК[101–103] привели лишь к незначительному изменению параметров, представленных Уотсоном и Криком. Ниже приводится краткое описание трех основных кристаллических форм ДНК, которые легко превращаются друг в друга в зависимости от относительной влажности и типа катиона, связанного с остатком фосфорной кислоты.

Ф о р м а А[104] представляет собой истинную кристаллическую форму соли ДНК, которая образуется при относительной влажности препарата ниже 80%. На один виток спирали в этой форме приходится 11 оснований, которые отклонены на угол 20° от перпендикуляра к оси спирали. Расстояние между основаниями составляет 2,56 Å и угол вращения 32,7°. Плоскости двух оснований, составляющих пару, не копланарны, и двугранный угол между ними составляет 16°. Молекула имеет ось симметрии второго порядка, перпендикулярную оси спирали, следовательно, две составляющие двойную спираль цепи имеют противоположное направление. Форма А представляет собой правовращающую спираль, построение левовинтовой спирали для нее невозможно.

Ф о р м а В существует при относительной влажности >80% и является паракристаллической формой. В свете последних данных форма В все-таки может быть построена в виде левовинтовой спирали[105]. Однако поскольку формы А и В легко превращаются друг в друга, то из правовинтового характера формы А следует такая же направленность спирали в форме В[105].

Форма В играет особо важную роль, поскольку, по-видимому, она является той формой, в которой ДНК существует в водном растворе. В последующих работах по исследованию формы В[101–103] был уточнен ряд параметров, данных Уотсоном и Криком. В частности, диаметр спирали оказался равным 18 Å, основания размещены ближе к оси спирали, углеводные остатки значительно отклонены от оси спирали. Однако основные положения гипотезы Уотсона и Крика остались без изменения.

Сохранение формы B в водном растворе следует из данных по малоуглевому рентгеновскому рассеянию, которые определяют расстояние между соседними парами оснований в растворе ДНК, равным 3,2 Å в соответствии с моделью формы B [107, 333, 334]. Однако в водном растворе ДНК ведет себя как линейная молекула, если только ее длина достаточно мала (мол. вес $<0{,}3 \cdot 10^6$). При увеличении длины полинуклеотида его свойства постепенно приближаются к свойствам статистического клубка и при молекулярных весах выше $100 \cdot 10^6$ могут быть полностью описаны на основании этой модели [108—110].

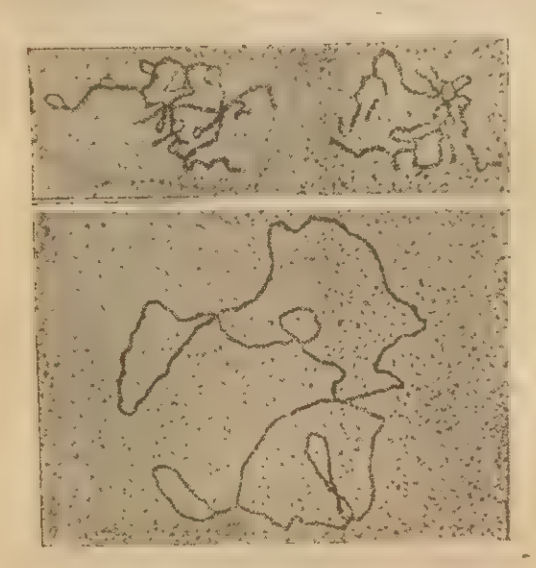


Рис. 4.12. Электронные микрофотографии ковалентно-замкнутых циклических ДНК митохондрий ооцитов *X. laevis* (*а*) и циклической ДНК этого же происхождения с одним разрывом в цепи (*б*) [118].

Форма С [106], третья и наименее влажная из всех трех форма, имеет виток спирали, состоящий из 9,3 нуклеотидных пар, и основания в ней отклонены от перпендикуляра к оси спирали на 5°.

2. Вторичная и высшие структуры циклических ДНК

Значительный интерес представляет структура недавно открытых циклических ДНК. Выше (см. стр. 48) уже упоминалось о существовании двух типов циклических молекул ДНК: нековалентно-замкнутой и ковалентно-замкнутой циклической ДНК. Вторичная структура таких молекул не отличается от вторичной структуры линейных ДНК, т. е. эти молекулы, очевидно, представляют собой обычную двойную спираль В-формы.*

В случае ковалентно-замкнутых ДНК появляются характерные особенности, которые необходимо рассмотреть более подробно ввиду важной роли этого типа ДНК в биологических системах [111, 335].

Доказательства существования таких ДНК были рассмотрены в гл. 1 (см. стр. 48). Эти молекулы отличаются от линейных и нековалентно-замкнутых циклических ДНК значительно более высоким коэффициентом седиментации [111, 112]. Так, например, репликативная форма ДНК фага ФХ174, обладающая ковалентно-замкнутой структурой [112], имеет коэффициент седиментации в 2 *M* NaCl при нейтральных значениях pH, равный 21 S, тогда как эта же ДНК, но с разрывами в одной из цепей имеет коэффициент седи-

ментации 17S *. На электронных микрофотографиях видны отчетливые различия между нековалентно-замкнутыми и ковалентно-замкнутыми циклическими ДНК (рис. 4.12). Во втором случае отчетливо видны циклические формы, тогда как в первом случае наблюдается большое число пересечений между цепями [111–119]. Эти данные позволяют сделать предположение о наличии у ковалентно-замкнутых циклических ДНК (из природных объектов) особой третичной структуры, в которой двойная спираль типа Уотсона — Крика уложена таким образом, что она образует еще дополнительную суперспираль, как это схематически изображено на рис. 4.13. Такая суперспираль может быть тороидальной (рис. 4.13, *а*) или самозакручивающейся (рис. 4.13, *б*). Эффект сверхспирализации наблюдается только для циклических ковалентно-замкнутых ДНК, выделенных из природных объектов или полученных с помощью полинуклеотид-лигазы (ДНК-лигазы [21, 315, 316]). Разрыв хотя бы одной фосфодиэфирной связи в сверхспиральной ДНК (например, под действием ДНК-зы) приводит к образованию нескрученной циклической молекулы.

Можно провести топологическое рассмотрение образования сверхспиральных структур [122–124]. Предположим, что в некоторых определенных условиях линейная двухцепочечная двухспиральная молекула имеет число витков двойной спирали, равное α **, и замыкается в этих условиях в циклическую структуру, так что 5′-конец каждой из цепей соединяется с 3′-концом этой же цепи. При этом ось двойной спирали образует плоский цикл, а каждая из цепей по-прежнему совершает вокруг нее α витков, как и в линейной молекуле. Если теперь изменить внешние условия, так что число витков двойной спирали изменится и станет не равным α (обозначим это новое число витков через β), то в силу замкнутости цикла ось двойной спирали сама станет спиральной, образуя сверхспираль и компенсируя таким образом изменение числа витков двойной спирали.

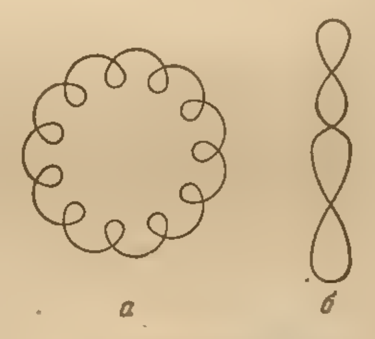


Рис. 4.13. Схематическое изображение тороидальной (*а*) и скрученной (*б*) форм сверхспиральной молекулы ковалентно-замкнутой циклической ДНК.

На рис. 4.14 схематически представлен гипотетический случай, когда в исходной

---

* О связи гидродинамических характеристик с молекулярным весом циклической ДНК см. [830].

** В структуре Уотсона и Крика число витков двойной спирали равно 1/10 общего числа пар оснований в молекуле. Однако при изменении условий (температуры, pH среды и т. д.) это число может уменьшаться (см. стр. 259). Число α равно также числу витков каждой из цепей вокруг оси спирали или вокруг другой цепи.

линейной двухцепочечной молекуле α равно 0 (две отдельные неспирализованные цепи). Замыкание такой молекулы в цикл дает циклическую структуру из двух цепей без сверх-спирализации (рис. 4.14, *а*). При закручивании цепей этой последней структуры в правовинтовую двойную спираль, например, по типу Уотсона — Крика ось молекулы должна образовывать либо правовращающую

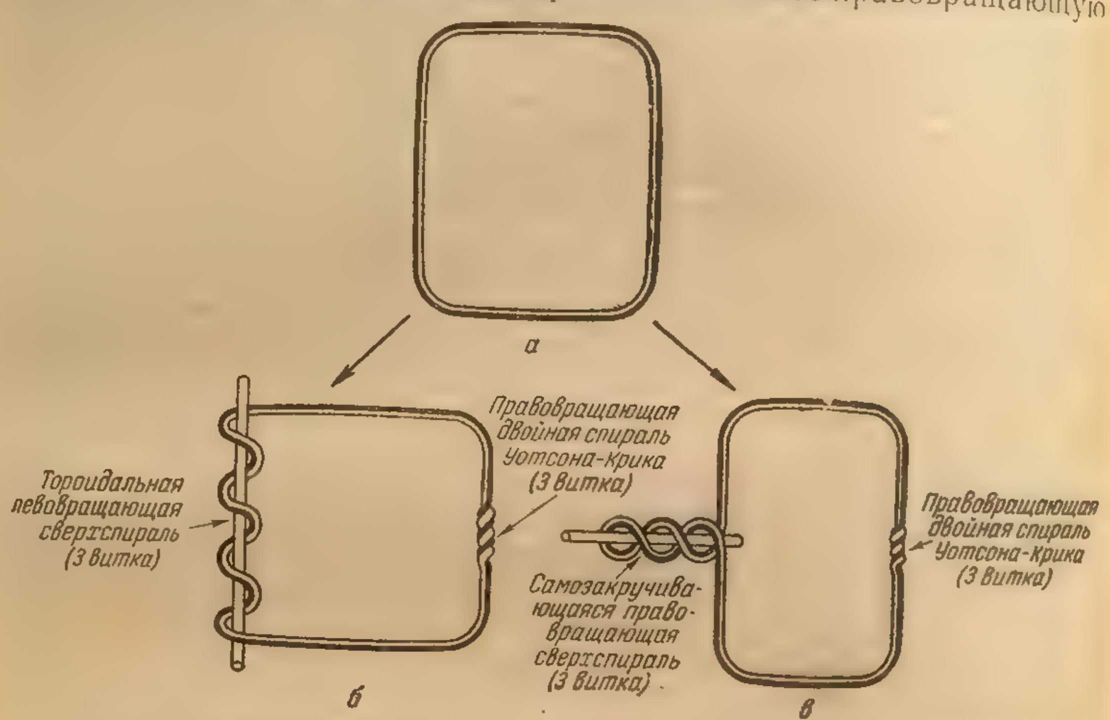


Рис. 4.14. Схема образования сверхспиральных структур в циклической ковалентно-замкнутой ДНК при $\alpha < \beta$ (см. текст).

самозакручивающуюся (рис. 4.14, *б*), либо левовращающую тороидальную (рис. 4.14, *в*) сверхспираль. При этом число витков τ сверхспиралей (обоих типов) равно числу вновь образовавшихся витков двойной спирали. Если бы две цепи образовали левовинтовую двойную спираль, то направление витков сверхспиралей было бы противоположным разобранному выше.

Если исходная линейная молекула уже спирализована по правовинтовому типу и после замыкания в цикл при изменении условий число правых витков увеличивалось, так что $[\beta] > [\alpha]$, то ось молекулы должна образовывать либо левовинтовую тороидальную, либо правовинтовую самозакручивающуюся сверхспираль с числом витков, равным числу вновь образованных витков двойной спирали $[\tau] = [\alpha] - [\beta]$. При уменьшении числа витков двойной спирали после циклизации получились бы сверхспирали противоположного направления. Если условиться считать величины α и β положительными для правовинтовых двойных спиралей, то число и направление витков сверхспирали задаются простой формулой $\tau = \alpha - \beta$.

При $\beta > \alpha$ образуется левовинтовая тороидальная или правовинтовая самозакручивающаяся сверхспираль. В соответствии с приведенной формулой такие сверхспирали характеризуются отрицательным знаком τ. Правовинтовая тороидальная и левовинтовая самозакручивающаяся сверхспирали образуются при $\beta < \alpha$ и характеризуются положительным знаком τ.

Все известные в настоящее время ковалентно-замкнутые циклические ДНК, выделенные из природных объектов, обладают сверхспирализацией правовинтового самозакручивающегося типа ($\tau < 0$). Сверхспирали с $\tau > 0$ образуются в искусственных условиях при расплетании двойной спирали в ковалентно-замкнутых ДНК (из природных источников) под действием внешних факторов (см., например, стр. 271).

Таким образом, число и направление витков сверхспирали зависит от условий, в которых происходит замыкание ковалентного цикла (они определяют величину α), и от условий, в которых рассматривается изучаемая молекула (определяют величину β). Изучение сверхспирализации ДНК, замкнутых *in vitro* с помощью ДНК-лигазы[315, 316, 331, 332], подтверждает это положение. При этом оказывается[315], что степень сверхспирализации в каждых данных условиях зависит от соотношения температуры и ионной силы среды при образовании сверхспирали и в процессе замыкания цикла *. Очень высокую степень сверхспирализации удается получить[316], если замыкание цикла проводить в присутствии интеркалирующих красителей (вызывающих частичное расплетание двойной спирали ДНК), а после циклизации удалить их из молекулы ДНК. Исследование сверхспирализации ковалентно-замкнутых ДНК, выделенных из различных источников, может пролить свет на условия их образования *in vivo*. В качестве меры степени сверхспирализации ДНК можно принять число витков сверхспирали, приходящееся на единицу длины молекулы. Иногда используют величину σ, называемую плотностью сверхспирали, которая является частным от деления числа сверхспиральных витков τ на число $\beta°$, равное $1/20$ общего числа нуклеотидов в изучаемой двухспиральной молекуле.

$$\sigma = \tau/\beta°$$

Изучение третичной структуры циклических ДНК с помощью интеркалирующих красителей. Как известно[124], фенантридиновый краситель этидийбромид

N^+

C_2H_5 Br^-

* Предполагают, что изменение ионной силы среды приводит к изменению среднего угла поворота соседних пар оснований в двойной спирали относительно друг друга[331, 332].

способен взаимодействовать с ДНК. При этом предполагают[337], что ароматический цикл красителя внедряется (интеркалируется) между двумя соседними парами оснований *, уменьшая угол поворота между ними примерно на 12°. По мере внедрения этидийбромида должно происходить, следовательно, расплетание двойной спирали, что для циклической ДНК означает уменьшение β. При начальном условии $\alpha < \beta$ действие красителя должно приводить к уменьшению числа супервитков, и молекула ДНК в целом должна стремиться к плоской циклической конфигурации, в которой $\alpha = \beta$. По мере дальнейшего внедрения красителя β становится меньше α, и следует ожидать закручивания суперспирали в противоположную сторону.

В том случае, когда уже в исходной молекуле $\alpha > \beta$, молекула ДНК не будет превращаться под действием этидийбромида в исходную плоскую форму, закручиваясь сильнее по мере увеличения количества внедрившегося в нее красителя. Есть данные, что по мере увеличения количества внедрившегося красителя коэффициент седиментации циклических ДНК сначала убывает, а затем, пройдя через минимум, начинает возрастать, стремясь в пределе к постоянному значению[126, 127].

Минимальное значение коэффициента седиментации соответствует, очевидно, превращению молекулы из сверхспирализованной в плоскую циклическую; последующее увеличение коэффициента седиментации соответствует закручиванию в противоположную сторону. Эти опыты показывают, что в ДНК, выделенных из природных источников, $\alpha < \beta$. Из данных подобного рода можно оценить число сверхспиральных витков в циклической ДНК. Зная число молей связанного красителя, приходящееся на одну пару нуклеотидов в точке эквивалентности, молекулярный вес ДНК и угол поворота, вызываемого внедрением молекулы красителя, легко рассчитать, сколько витков двойной спирали и, следовательно, суперспирали разовьется под действием данного количества красителя.

Эксперименты такого рода приводят к выводу, что во многих случаях плотности сверхспирали σ для различных ДНК близки по величине и для ДНК вирусов папиломы[127, 128], митохондриальной ДНК печени цыпленка[126], ДНК вируса SV 40[124] и вируса полиомы[127, 128] σ колеблются от $-0{,}03$ до $-0{,}04$. Подобные значения получены также для циклических ДНК из *E. coli*[332] фага λ[332] и репликативной формы ДНК фага ФХ174[338]. Значительно более низкие значения плотности сверхспирали найдены для ДНК клеток HeLa и яиц морского ежа[316].

Число и знак сверхспиральных витков могут быть определены также с помощью электронной микроскопии[114, 129, 336].

* Аналогичный эффект вызывают антибиотики, такие, как актиномицин[338].

Можно полагать, что во всех циклических ковалентно-замкнутых ДНК наблюдаются третичные структуры, подобные описанным выше, что придает таким молекулам особые, отличные от обычных линейных ДНК свойства.

V. ИССЛЕДОВАНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РНК

В настоящее время уже известно[130–141] довольно значительное количество двухспиральных РНК, которые отличаются от обычных односпиральных следующими показателями:

1. Подчиняются правилу Чаргаффа (т. е. отношения аденин : урацил и гуанин : цитозин примерно равны 1).

2. Обладают значительно более низкой молярной экстинкцией, чем обычные РНК.

3. При нагревании подвергаются кооперативному переходу из спиральной в денатурированную форму (см. ниже).

4. В обычных условиях не реагируют с формальдегидом, что характерно для двухспиральных водородно-связанных молекул.

5. Обладают значительно большей устойчивостью по отношению к действию рибонуклеазы по сравнению с обычными РНК.

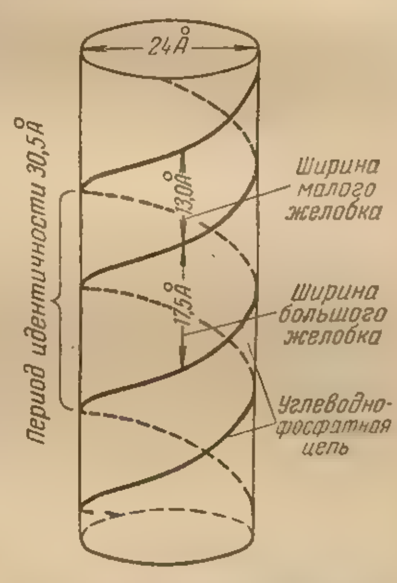


Рис. 4.15. Одна из возможных макроструктур двухспиральной РНК вируса карликовости риса[136].

Строение двухспиральных РНК из различных объектов за последнее время довольно интенсивно исследовалось с помощью рентгеноструктурного метода[130–133, 136, 140], однако до сих пор не удалось получить столь же определенных выводов о тонкой структуре молекулы, как в случае ДНК. Для РНК вируса карликовости риса[136] на основании данных рентгеноструктурного анализа и кругового дихроизма в ИК-области была принята структура, которая отличается от структуры А- и В-форм ДНК. Если принять, что атомы фосфора этой РНК образуют стенки цилиндра, то диаметр цилиндра равен 18 или 24 Å с числом нуклеотидов на один виток спирали, равным 10 (рис. 4.15). Однако проведенные недавно исследования структуры кристаллов двухспиральных РНК реовируса[131–133] показывают, что рентгенограммы хорошо согласуются с двумя возможными моделями двухспиральной РНК, одна из которых включает 10 нуклеотидных звеньев на виток спирали, а другая 11. Для первой модели основания должны быть отклонены от перпендикуляра к оси спирали

на 10°, для второй — на 14°. В первой модели (10 нуклеотидов на виток) основания повернуты относительно друг друга на 36°, во второй модели — на 32,7°. Расстояние между парами оснований для двух моделей равно 3 и 2,73 Å соответственно при высоте витка в обоих случаях 30 Å. Несмотря на то что вторая модель — с 11 нуклеотидами на виток спирали — несколько лучше согласуется с экспериментальными данными, в настоящее время нельзя исключить и первую модель, с 10 нуклеотидами на виток спирали *.

Отличительной чертой двухспиральной РНК является независимость конформации от содержания воды в кристалле [112, 143], что наблюдается также для синтетических двухспиральных полирибонуклеотидов. По-видимому, эти отличительные особенности связаны не с тем фактом, что в РНК содержится урацил вместо тимина (в ДНК), поскольку ДНК фага PBS2, которая содержит урацил вместо тимина, обладает обычной для ДНК конформацией [144]. Следовательно, можно предположить, что либо тип спаривания оснований в молекуле двухспиральной РНК отличается от того, который имеет место в двухспиральной ДНК, либо каким-то образом на конформацию полинуклеотида влияет остаток сахара, различный в этих двух типах полинуклеотидов. Первое из этих предположений следует исключить, поскольку рентгеноструктурный анализ двухспиральных молекул, получаемых при взаимодействии синтетических полирибонуклеотидов, показывает, что дифракционную картину, близкую к наблюдаемой для двухспиральных РНК, дают лишь те двойные спирали, которые образованы комплементарными полинуклеотидами [143]. Таким образом, отличие конформации двухспиральной РНК от двухспиральной ДНК связано, по-видимому, с различиями в строении углеводного остатка в этих двух макромолекулах.

VI. РАЗРУШЕНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ ДВУХСПИРАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ (ДЕНАТУРАЦИЯ)

Вторичная структура двухспиральных ** двухцепочечных нуклеиновых кислот может быть разрушена в результате различных

* Недавно обсуждалась возможность существования трех форм РНК (по данным рентгеноструктурного анализа двухспиральных синтетических полирибонуклеотидов). Эти формы отличаются числом пар оснований на виток спирали и другими количественными характеристиками, однако они значительно ближе друг к другу, чем А- и В-формы ДНК [839].

** Здесь и далее под термином «односпиральный» полинуклеотид понимается однотяжевая структура, в которой имеются лишь межплоскостные (стопочные) взаимодействия между соседними основаниями цепи. Под термином «двухспиральный» полинуклеотид понимается структура, в которой помимо указанного стопочного взаимодействия наблюдается образование комплементарных пар оснований, принадлежащих различным участкам одной цепи или разным полинуклеотидным цепям. В такие комплементационные взаимодействия могут вовлекаться все основания вдоль полинуклеотидных цепей (двухспиральная ДНК) или лишь некоторые из них — частично двухспиральные структуры (например, тРНК).

воздействий, причем в зависимости от степени воздействия может происходить полная или частичная потеря характерных для двойной спирали свойств, и в конечном итоге могут образоваться две одинарные полинуклеотидные цепи.

Если постепенно нагревать раствор двухспиральных полинуклеотидов, то в некотором, определенном для данного полинуклеотида интервале температур, наблюдается резкое изменение свойств

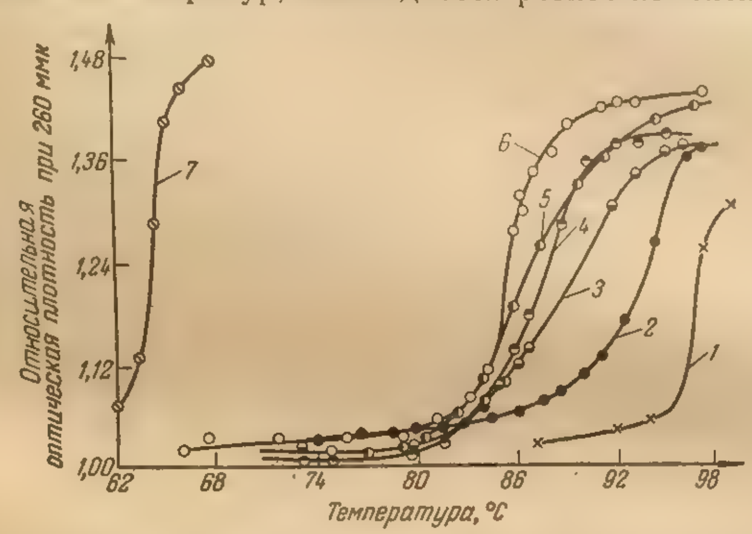


Рис. 4.16. Изменение оптической плотности при 260 *ммк* в процессе денатурации двухспиральных полинуклеотидов [145]:

1 — ДНК *Mycobacterium phlei*; *2* — ДНК *Serratia marcesceus*; *3* — ДНК *Escherichia coli*; *4* — ДНК зобной железы теленка; *5* — ДНК спермы лосося; *6* — ДНК *Diplococcus pneumococeus*; *7* — двухспиральный комплекс поли-dAdT; все в 0,1 *М* растворе NaCl с добавкой 0,015 *М* цитрата натрия.

раствора — возрастание оптической плотности, уменьшение оптического вращения и вязкости, увеличение коэффициента седиментации и т. д. Эти изменения связаны с разрушением двухспиральной молекулы, приводящим в конечном итоге к разделению двух комплементарных полинуклеотидных цепей. Наиболее распространенным способом детектирования момента такого перехода является измерение оптической плотности в процессе денатурации. На рис. 4.16 в качестве примера приведено изменение оптической плотности различных ДНК при нагревании. Видно, что увеличение плотности происходит в довольно узком интервале температур, причем, начиная с некоторой температуры, поглощение вновь перестает меняться. Если принять, что оптическая плотность при низкой температуре соответствует полностью спирализованной молекуле, а в конце плавления — молекуле с полностью разрушенной вторичной структурой, то легко вычислить долю спиральных θ и неспиральных $1-\theta$ участков в некоторой промежуточной точке перехода по формуле

$$\theta = \frac{D_\infty - D_t}{D_\infty - D_0}$$

где D_∞ — оптическая плотность раствора полностью денатурированной молекулы; D_t — оптическая плотность раствора полинуклеотида при некоторой промежуточной температуре; D_0 — оптическая плотность раствора полинуклеотида при низкой температуре.

Температура, при которой доли спиральных и неспиральных участков равны ($\theta = 1 - \theta = 0{,}5$), называется температурой плавления полинуклеотида и обозначается T_m (рис. 4.17). Для данного двухспирального полинуклеотида при постоянных внешних условиях (значение pH, ионная сила среды, давление и т. д.) величина T_m постоянна и характеризует стабильность двухспиральной структуры. Другой характеристикой процесса денатурации является ширина интервала перехода из нативного в денатурированное состояние ΔT_m, которая отражает кооперативность перехода, т. е. степень одновременности разрушения всех звеньев спиральной структуры при повышении температуры. Если бы все звенья ДНК разрушались одновременно при одной и той же температуре, то ΔT_m было бы равно нулю. Однако «плавление» ДНК никогда не происходит таким образом, и процесс проходит через непрерывный ряд частично денатурированных состояний, поэтому ΔT_m не равно нулю (см. стр. 263). Величина ΔT_m определяется разностью температур, при которых касательная к точке T_m на кривой зависимости $1 - \theta$ от температуры пересекает прямые $1 - \theta = 1$ (полная денатурация) и $1 - \theta = 0$ (отсутствие денатурации), как показано на рис. 4.17 [146]. Для двухспиральных молекул характерна довольно малая величина ΔT_m (3—7° С), что существенно отличает их от односпиральных и частично двухспиральных молекул.

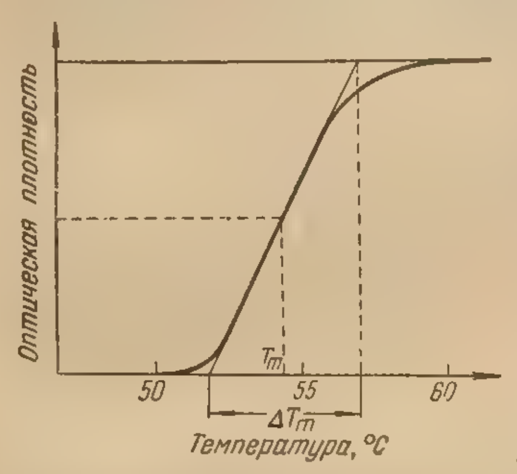


Рис. 4.17. Анализ кривой денатурации ДНК (см. текст).

Температура плавления двухспиральных молекул зависит от многих факторов, важнейшие из которых рассмотрены ниже.

1. Факторы, влияющие на тепловую денатурацию

Длина молекулы. С уменьшением молекулярного веса полинуклеотида величина его T_m понижается [147—151]. Этот эффект исследовался на природных и синтетических полинуклеотидах и особенно четко проявляется в случае коротких олигомеров. Так, например, при взаимодействии поли-A и поли-U в присутствии ионов магния в D_2O при pD7 тетрануклеотиды образуют комплекс с

$T_m = 17°$ C, а гексануклеотиды — с $T_m = 27°$ C[147]. По мере увеличения длины молекулы различия в температурах плавления двухспиральных полинуклеотидов уменьшаются.

Нуклеотидный состав. Температура плавления двухспиральных полинуклеотидов зависит также от их состава. С увеличением содержания пар гуанин · цитозин T_m двухспиральных молекул линейно увеличивается[121, 145, 212, 343–347], как показано на рис. 4.18 (ср. с данными о стабильности пар оснований, стр. 225). В качестве модели для установления зависимости T_m полинуклеотида от состава оснований можно использовать синтетические олигонуклеотиды. При наличии возможности образования трех водородных связей на пару оснований температура плавления соответствующих двухспиральных полинуклеотидов повышается. Тем не менее число водородных связей на пару оснований само по себе не определяет однозначно T_m двухспирального полинуклеотида. Так, для двухспирального комплекса поли-2-аминоадениловой кислоты с полиуридиловой кислотой T_m значительно ниже, чем для двухспирального комплекса полицитидиловой кислоты с полигуаниловой кислотой, хотя число водородных связей у них одинаково[147]. Этот эффект уже был отмечен при взаимодействии мономерных компонентов нуклеиновых кислот (см. стр. 227).

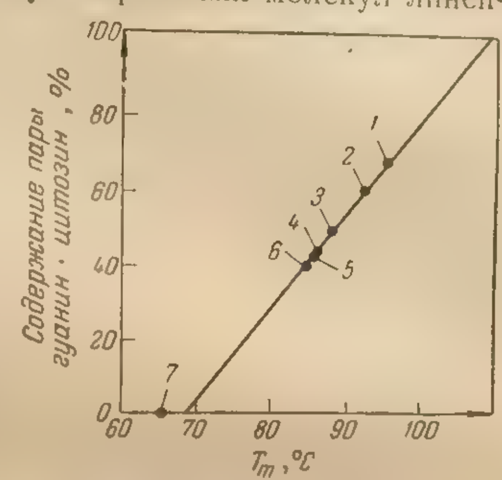


Рис. 4.18. Зависимость T_m двухспиральных полинуклеотидов от содержания пары гуанин · цитозин (обозначение точек на прямой — см. рис. 4.16).

Природа углеводного остатка. Двухспиральные полинуклеотиды располагаются по стабильности в следующий ряд[147]:

(поли-dI) · (поли-C) < (поли-dI) · (поли-dC) < (поли-I) · (поли-dC) < < (поли-I) · (поли-C)

(поли-dG) · (поли-dC) < (поли-dG) · (поли-C) < < (поли-G) · (поли-dC) < (поли-G) · (поли-C)

Эти ряды показывают, что двухспиральные рибополинуклеотиды более стабильны, чем двухспиральные дезоксирибополинуклеотиды. Такая закономерность наблюдается и для природных полинуклеотидов. Так, T_m двухспиральной РНК вируса карликовости риса на 15° выше, чем T_m ДНК с подобным составом оснований[135]. Данный эффект, возможно, связан с образованием водородных связей между гидроксилом остатка рибозы и соответствующим основанием

в полирибонуклеотиде, что приводит к усилению межплоскостных взаимодействий вследствие уменьшения свободы вращения основания вокруг гликозидной связи[76] (см. стр. 142). Однако такое объяснение нельзя считать единственным. Различие в стабильности двухспиральных комплексов может быть связано с взаимодействиями с растворителем или с изменением конформации кольца углеводного остатка.

Зависимость от внешних факторов. Температура плавления двухспиральных полинуклеотидных комплексов повышается с увеличением ионной силы раствора, что связано с экранированием зарядов фосфатных групп. Практически линейная зависимость T_m от логарифма концентрации одновалентных ионов, наблюдаемая экспериментально (вплоть до концентрации 0,3 *моль/л*)[348], хорошо предсказывается теоретически на основании рассмотрения разности значений электростатической свободной энергии фосфатных групп спирализованного и денатурированного состояний[147] (см. стр. 279). При более высоких значениях ионной силы T_m двухспиральных полинуклеотидов достигает максимального значения и далее не меняется или падает[152a, 347]. Предпринимались попытки представить T_m двухспиральных полинуклеотидов в виде функции от содержания пар гуанин · цитозин и от логарифма ионной силы среды[212, 346]. В ряде случаев были получены уравнения, довольно хорошо согласующиеся с экспериментальными данными[346].

При концентрации солей $\sim 10^{-4}$ *М* ДНК денатурирует при комнатной температуре. Наблюдается определенная специфичность по отношению к различным ионам, присутствующим в растворе. Присутствие некоторых двухвалентных ионов (Mg^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}) увеличивает T_m ДНК, тогда как другие (Cu^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}) оказывают противоположный эффект.

В настоящее время нет единого мнения по поводу причин различного действия ионов и, хотя известно, что катионы сильно связываются с ДНК, не ясно, происходит ли это за счет неспецифических электростатических эффектов или имеет место также и специфическое химическое связывание[147].

Температура перехода от упорядоченного к денатурированному состоянию сильно зависит и от кислотно-основных свойств среды[153—155]; при pH ниже 2,7 и выше 12 денатурация ДНК наблюдается уже при комнатной температуре. В то же время в интервале pH 5,5—8,5 T_m ДНК мало зависит от pH[109, 154]. Наблюдаемая зависимость от pH объясняется ионизацией оснований[154]. Исходя из изменений УФ-спектров[348—351], дисперсии оптического вращения[350—353] и кругового дихроизма[354] при кислотном титровании двухспиральных полинуклеотидов, был сделан вывод, что денатурации предшествует значительное протонирование остатков одного из оснований пары гуанин · цитозин. Однако пока неясно, какое из этих двух оснований протонируется в большей степени. При щелоч-

ной денатурации первым этапом, по-видимому, является ионизация остатков гуанина [355].

Наконец, на T_m двухспиральных молекул влияет присутствие в растворе различных веществ, таких, как мочевина, гуанидин и т. д. [109]. На T_m ДНК оказывает влияние присутствие органических растворителей. Это понятно с точки зрения теории Синаноглу (см. стр. 248), поскольку с уменьшением поверхностной энергии растворителя уменьшается различие в свободной энергии нативной ДНК, обладающей малой поверхностью, и денатурированной ДНК, обладающей большой поверхностью. На переход спираль — клубок для ДНК отмечалось также влияние давления [156, 356], концентрации ДНК [157, 357] и т. д.

Конечным итогом денатурации при действии температуры, кислоты или щелочи может быть разделение цепей двухспиральной молекулы [109]. Это следует из очень медленного восстановления свойств, характерных для исходной (нативной) ДНК, в процессе ренатурации (см. ниже) после достаточно продолжительного инкубирования ДНК в условиях денатурации. С этим согласуется, кроме того, второй порядок скорости реакции ренатурации, данные электронной микроскопии [358, 359], а также изменение гидродинамических характеристик молекулы при денатурации [109, 360]. Однако наиболее убедительным доказательством, по-видимому, является возможность разделения комплементарных цепей после денатурации [109, 185—195].

Менее ясен вопрос о денатурации под действием органических растворителей. Хотя при действии формамида разделение цепей происходит [198], вероятно, возможны случаи денатурации и без разделения цепей [158].

Процесс денатурации не является процессом типа «все или ничего» и проходит через ряд промежуточных состояний, характеризующихся при каждой данной температуре определенным равновесным распределением локально денатурированных областей. Это следует, в частности, из сопоставления изменения вязкости и оптической плотности в процессе денатурации [182]. Из подобных сопоставлений удается также оценить среднюю длину локально денатурированных областей в интервале плавления [182]. Образование в процессе денатурации частично денатурированных молекул является причиной известного эффекта расхождения температур плавления ДНК, определенных путем измерения изменений оптической плотности непосредственно в процессе нагревания раствора и после охлаждения нагретого до каждой данной температуры раствора. Величина T_m, определенная первым способом, на несколько градусов ниже, поскольку изменение оптической плотности непосредственно в процессе нагревания отражает нарушение спиральной структуры, не обязательно сопровождающееся разделением комплементарных цепей, тогда как при втором способе разделение

комплементарных цепей является обязательным условием фиксируемого изменения оптической плотности [109]. Эти опыты привели к предположению о существовании в ДНК термостабильных «ядер» — участков, богатых па́рами гуанин · цитозин, которые удерживают комплементарные цепи частично денатурированной молекулы вместе.

Возможность существования двухспиральной молекулы ДНК как целого со значительными нарушениями внутри двойной спирали следует из опытов по денатурации ДНК путем нагревания в присутствии формальдегида [179—181]. На электронных микрофотографиях обработанной таким образом ДНК обнаруживаются локально денатурированные участки, относительное содержание нуклеотидов в которых увеличивается с повышением температуры или увеличением продолжительности обработки формальдегидом. Распределение таких участков не случайно, а соответствует всегда определенным местам молекулы. Можно полагать, что это участки, богатые па́рами аденин · тимин. По мере повышения температуры размеры таких участков увеличиваются, они сливаются, и конечным результатом является разделение комплементарных цепей. Следует отметить, что денатурация в присутствии формальдегида отличается от обычной тепловой денатурации, поскольку она сопровождается химическим взаимодействием с формальдегидом, так что ренатурация областей, содержащих модифицированные звенья, невозможна. В результате этого при каждой данной температуре — а не только при температуре плавления — конечным итогом денатурации является разделение цепей [181]. Поэтому на основании опытов с использованием формальдегида для фиксации частично денатурированных областей в молекулах ДНК в интервале плавления нельзя делать выводов об истинных размерах и распределении этих областей при данной температуре в отсутствие формальдегида.

2. Особенности денатурации циклических ДНК

Если в линейной и в нековалентно-замкнутых ДНК в процессе денатурации возможно разделение цепей, то в двухспиральной циклической ковалентно-замкнутой ДНК этот процесс исключен. Кроме того, на процессы денатурации в этом случае оказывает влияние наличие сверхспиральной структуры.

При определении плавучей плотности ковалентно-замкнутой ДНК вируса полиомы (так называемой ДНК I) в градиенте плотности хлористого цезия с изменяющимся значением pH (щелочная область) наблюдается двухстадийный переход к денатурированному состоянию, характеризующемуся большей плавучей плотностью. Сопоставление этих результатов с аналогичными данными по изменению плавучей плотности той же самой ДНК, но с раз-



рывом в одной из цепей, вызванным, в частности, действием ДНК-азы (так называемой ДНК II, рис. 4.19), показывает, что ранний переход для ДНК I наблюдается в областях pH более низких, чем для ДНК II, тогда как поздняя стадия денатурации для ДНК I происходит при заметно более высоких значениях pH [122].

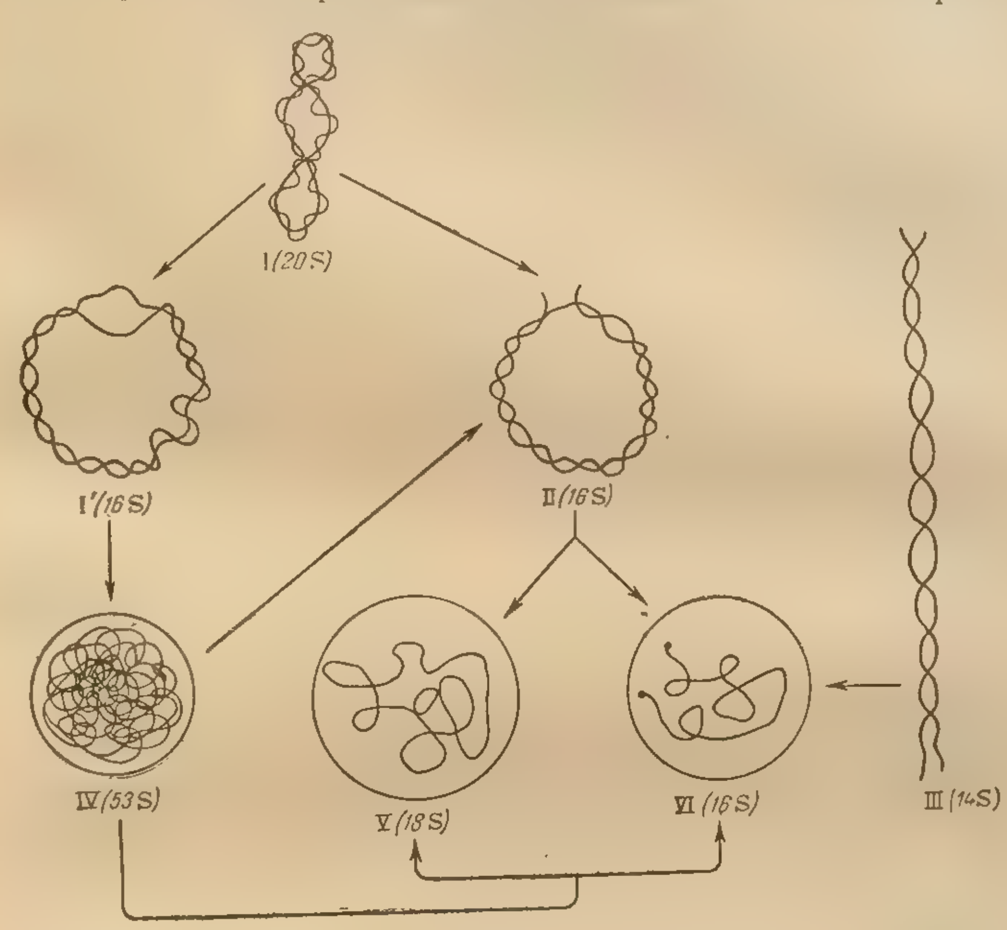


Рис. 4.19. Схема превращений циклической ковалентно-замкнутой ДНК (см. текст) [161].

Аналогичные изменения наблюдаются при исследовании зависимости коэффициента седиментации от pH [117, 159, 161].

Это, по-видимому, означает, что первым этапом денатурации ковалентно-замкнутой ДНК является расплетание части двухспиральной структуры Уотсона — Крика, в результате чего уменьшается величина β (см. стр. 257) и соответственно, поскольку $\alpha < \beta$ (см. стр. 259), уменьшается число супервитков τ, т. е. происходит раскручивание молекулы, которое заканчивается образованием плоской циклической молекулы ДНК с частично денатурированной расплетенной областью или областями (I′ на рис. 4.19).

При дальнейшем подщелачивании ДНК I′ продолжается раскручивание двойной спирали Уотсона — Крика, однако в отличие от линейной и нековалентно-замкнутой ДНК этот процесс происходит без разделения цепей, что понижает энтропию денатурированного состояния и, следовательно, делает денатурацию менее выгодной (чем в случае линейной и нековалентно-замкнутой ДНК). Конечным итогом денатурации является образование плотного клубка с высоким коэффициентом седиментации (IV на рис. 4.19). Если в такой денатурированной молекуле провести разрыв в одной из цепей, то возникают циклическая одноцепочечная ДНК с коэффициентом седиментации 18S (V на рис. 4.19) и линейная одноцепочечная ДНК с коэффициентом седиментации 16S (VI). Формы V и VI получаются также при щелочной денатурации ДНК II.

Другой интересной особенностью циклических ДНК, наблюдаемой при щелочной денатурации, является очень быстрая ренатурация при нейтрализации щелочного раствора такой денатурированной ДНК, если значение pH не превышает 12,5. При денатурации щелочью более высоких концентраций не удается добиться ренатурации (после нейтрализации) [159] в условиях, когда ДНК II легко ренатурирует *. Необратимо денатурированная ковалентно-замкнутая ДНК после нейтрализации и обработки панкреатической ДНК-зой спонтанно ренатурирует [361], образуя циклическую ДНК II с односпиральными разрывами; данный процесс протекает значительно быстрее, чем ренатурация ДНК II. Это означает, по-видимому, что необратимая денатурация ДНК I происходит без разрыва цепей ДНК, однако в процессе денатурации они сдвигаются относительно друг друга вдоль оси спирали, после чего образование полностью комплементарной структуры при нейтрализации затруднено из-за случайного образования «ненативных» комплементарных пар [159, 362]. Возможно также, что воссоздание вновь исходной комплементарной структуры затруднено стерически из-за образования сверхспиральной структуры. Быстрая спонтанная ренатурация после образования единственного одноцепочечного разрыва объясняется, очевидно, тем, что при этом происходит быстрое раскручивание сверхспиральной денатурированной структуры и две цепи, находясь в непосредственной близости друг от друга, могут легко образовать полностью комплементарную двухспиральную структуру, как это происходит, например, при ренатурации денатурированной ДНК со сшивками между комплементарными цепями [160].

Термическая денатурация циклической ДНК происходит при значительно более высокой температуре и характеризуется более высокой величиной ΔT_m по сравнению с линейными или нekова-

* В щелочном растворе при pH 12 и температуре 50° С ренатурация такой ДНК происходит, однако, довольно быстро.

лентно-замкнутыми ДНК[122]. Такое возрастание T_m циклической ДНК легко понять с точки зрения энтальпийно-энтропийных изменений, происходящих при плавлении. Поскольку $T_m = \Delta H/\Delta S$ и поскольку, как уже отмечалось, ΔS при денатурации циклической ДНК меньше, чем ΔS при денатурации линейных ДНК (вследствие невозможности расхождения цепей), тогда как ΔH в обоих случаях одинаковы, то T_m для циклической ДНК должна быть существенно выше. Следует отметить, что гиперхромного эффекта, соответствующего первой стадии перехода (раскручивание сверхспиральной структуры), при тепловой денатурации заметить не удается, так как переход в форму I сопровождается расплетанием всего $\sim$1—3% спиральной структуры.

Образование формы I наблюдается также при денатурации циклических ковалентно-замкнутых ДНК в присутствии формальдегида[162]. Нагревание ДНК I вируса полиомы в присутствии формальдегида приводит к образованию молекулы, седиментирующей с той же скоростью, что и ДНК II, однако не имеющей разрывов. Формальдегид, присоединяясь по денатурированным за счет нагревания участкам, препятствует их последующей спирализации при охлаждении[163]. Электронная микрофотография обработанной таким образом ДНК вируса папиломы[162] показывает, что после обработки образуется смесь сверхспирализованных и плоских циклических ДНК, причем относительное содержание последних в смеси растет с повышением температуры обработки. Максимальное число плоских молекул образуется при 42° С; при этой температуре найдено всего лишь 8% сверхспирализованных молекул. Однако при повышении температуры их число снова увеличивается. Это означает, что процесс тепловой денатурации происходит таким же способом, как и щелочная денатурация: форма I превращается в плоскую форму I′, которая затем снова образует сверхспиральную структуру, но уже с противоположным направлением сверхспирали.

Кинетика денатурации. Понимание особенностей вторичной структуры полимеров во многом зависит от знания кинетических характеристик процессов ее разрушения и образования. До последнего времени этой проблеме в исследованиях нуклеиновых кислот уделялось мало внимания, что было связано во многом с отсутствием техники измерения скоростей быстрых процессов. Однако теперь уже имеется ряд сведений по этому вопросу, позволяющих сделать некоторые выводы о механизме денатурации.

Основной принцип измерения кинетики денатурации заключается в быстром помещении ДНК в денатурирующие условия и определении изменений любых характерных для двухспиральной молекулы особенностей в зависимости от времени. Наиболее часто для характеристики процесса денатурации используют изменение оптических свойств. Денатурацию вызывают либо действием тепла, либо изменением кислотности среды.

При быстром добавлении к раствору ДНК щелочи до pH 12,5 наблюдается быстрая денатурация, как это следует из изменения оптических свойств[164, 165] (наблюдается максимальный гиперхромный эффект). Однако если через достаточно короткий промежуток времени произвести нейтрализацию раствора, то исходная двухспиральная структура сохраняется, о чем можно судить по значению коэффициента седиментации[166, 167]. Нейтрализация после более продолжительного воздействия щелочью не приводит к восстановлению исходной вторичной структуры и, судя по коэффициенту седиментации, ее результатом является образование односпиральных клубкообразных молекул. Меняя продолжительность обработки щелочью, можно определить время, необходимое для необратимой денатурации. Это время зависит от температуры и вязкости среды *. Полученные результаты согласуются с предположением о денатурации путем раскручивания двухспиральной молекулы. Скорость такого процесса должна уменьшаться с увеличением вязкости среды, время раскручивания должно увеличиваться с увеличением длины молекулы.

Более полную информацию о механизме процесса можно получить из кинетических данных по тепловой денатурации — раствор ДНК нагревают в течение очень короткого времени и затем регистрируют изменения оптической плотности[168–174] или полярографических характеристик[175–177]. При этом оказывается, что кинетическая картина превращения различна в зависимости от соотношения между температурой T_1 исходного раствора ДНК, температурой плавления данной ДНК T_m и конечной температурой T_2. Если T_1 на 20—30° С ниже T_m и если T_2 не очень высока (на 5—10° С выше T_m), то фиксируемые изменения свойств молекулы начинаются после заметного индукционного периода[172]. Этот индукционный период исчезает при увеличении T_1 или T_2. Если уже при T_1 молекула ДНК имеет некоторое количество деспирализованных звеньев, то при достаточно высоком значении T_2 наблюдается стадия мгновенного увеличения степени деспирализации, характеризуемая моментальным увеличением оптической плотности, после чего следует быстрый, но поддающийся измерению процесс дальнейшего возрастания оптической плотности. Величина первоначального скачка увеличивается с увеличением T_1 и T_2, и при достаточно высоких значениях T_2 фиксируемая вторичная структура исчезает полностью на первой, мгновенной, стадии. Время завершения процесса, следующего за моментальной стадией (при условии достаточно большой T_2 **), приблизительно пропорционально квадра-

* См. также[363]. Данные относительно зависимости скорости денатурации от молекулярного веса противоречивы[166, 167, 363].

** При малых T_2 наблюдается еще одна стадия, которая нами здесь не рассматривается, поскольку природа ее пока неясна.

ту молекулярного веса. Наличие мгновенной стадии денатурации наблюдалось также в опытах по кислотной денатурации ДНК, удельный вес этой стадии в общем процессе увеличивался с понижением конечной величины pH [178].

Мгновенная денатурация, по-видимому, происходит по тому же механизму, что и денатурация циклической ДНК — взаимодействие между основаниями нарушается без расплетания цепей. Последующая стадия, по-видимому, является процессом разделения полинуклеотидных цепей.

Труднее интерпретировать наличие индукционного периода при низких начальных температурах; возможно, он связан с необходимостью возникновения каких-то активных центров, требующихся для эффективного протекания процесса расплетания цепей [172].

VII. ПРОЦЕССЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ ДВУХСПИРАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ (РЕНАТУРАЦИЯ) *

Процесс восстановления разрушенной вторичной структуры называется ренатурацией. Изучение процессов восстановления вторичной структуры, нарушенной каким-либо из описанных выше способов, чрезвычайно важно и имеет не меньшее значение, чем исследование процессов ее разрушения. При проведении ренатурации денатурированной ДНК в оптимальных условиях (о которых будет сказано ниже) конечным итогом является по крайней мере частичное восстановление исходной (нативной) структуры ДНК. Такой вывод можно сделать на основании следующих данных.

1. Ренатурированная ДНК обладает оптическими свойствами (гипохромизм, оптическое вращение, круговой дихроизм), соответствующими нативным препаратам [109].

2. Гидродинамические характеристики полностью ренатурированной ДНК лишь незначительно отличаются от таковых для нативной двухцепочечной ДНК и сильно отличаются от характеристик денатурированной молекулы [109, 198].

3. Рентгеноструктурный анализ ренатурированной ДНК дает типичную для В-формы ДНК дифракционную картину [109].

4 Электронно-микроскопические исследования показывают, что (в случае недеградированных препаратов) при ренатурации образуются молекулы, соответствующие по длине и диаметру нативным [109, 183, 184].

Совокупность перечисленных данных дает возможность утверждать, что ренатурированная молекула по физическим свойствам соответствует нативной, однако делать из них выводы о том, что это истинная нативная форма, нельзя. Информация об этом в на-

* Обзор — см. [109, 364].

стоящее время может быть получена, по-видимому, только путем биологической оценки ренатурированной ДНК. Существует уже довольно много исследований, в которых констатируется восстановление биологических свойств при ренатурации. Среди них можно отметить восстановление трансформирующей активности «трансформирующих» ДНК (денатурированные молекулы неактивны). Восстановление биологической активности происходит в процессе ренатурации, причем скорость этого процесса совпадает со скоростью ренатурации (по оценке с помощью спектрофотометрии [152]).

В последние годы разработаны методы разделения комплементарных цепей ДНК [185–195]. При ренатурации отдельных нитей ДНК фага λ, каждая из которых не обладает биологической активностью (не более 10% исходной), наблюдается восстановление биологической функции примерно наполовину [188]. Важно отметить, что взаимодействуют с образованием двухспиральной молекулы только комплементарные цепи; цепи одного типа не способны к ренатурации.

При ренатурации восстанавливаются также иммунохимические свойства, характерные для двухспиральных молекул [109].

При использовании для ренатурации деградированных препаратов ДНК наблюдаются заметные отличия в физических свойствах ренатурированных и исходных молекул [198]. Например, на электронных микрофотограммах ренатурированных молекул наблюдаются клубкообразные концы, тогда как середина молекулы имеет вид, характерный для двухспиральных комплексов [359]. Односпиральные концы этих молекул могут образовывать двухспиральные участки с комплементарными односпиральными концами, в результате чего возникают агрегаты большого молекулярного веса [198]. Молекулы, отличающиеся от нативных, получаются также, по-видимому, при ренатурации денатурированной ДНК с циклическими перестановками, как, например, для ДНК Т-четных фагов. Здесь также возможно образование агрегатов, состоящих из большого числа молекул [198].

Все это является свидетельством случайного сочетания комплементарных цепей в процессе ренатурации, в результате чего могут объединяться цепи, имеющие различную длину.

Случайный характер процесса ренатурации был убедительно показан в опытах с молекулами ДНК меченными тяжелыми изотопами азота и водорода. Двухспиральная молекула, обе цепи которой содержат тяжелые изотопы, имеет заметно большую плавучую плотность, чем полностью немеченая ДНК. После денатурации эквимольной смеси меченной таким образом и немеченой ДНК последующая ренатурация приводит к возникновению трех зон, соответствующих по плавучей плотности полностью меченой (тяжелой), полностью немеченой и промежуточной ДНК, т. е. двухспи-

ральной ДНК с одной меченой и одной немеченой комплементарными цепями *. Отношение количества ДНК в этих зонах соответствовало 1 : 1 : 2, что отвечает случайному характеру ренатурации [109, 196].

1. Факторы, влияющие на процесс ренатурации

Имеются два рода факторов, влияющих на ренатурацию: факторы, зависящие от свойств самой ДНК, т. е. структурные, и факторы, связанные с условиями ренатурации.

Структурные факторы. К первой группе факторов, естественно, относятся молекулярный вес и нуклеотидный состав ДНК, а также особая характеристика — сложность ДНК. Она представляет собой число нуклеотидных пар в неповторяющихся последовательностях ДНК [184, 365]. Для ДНК вирусов и бактерий сложность ДНК равна просто числу нуклеотидных пар в интактной недеградированной молекуле, поскольку ДНК этих организмов не содержит повторяющихся последовательностей достаточно большой длины [365]. Однако в ДНК высших организмов имеется, по-видимому, очень большое число повторяющихся последовательностей по 200—300 нуклеотидных единиц [365].

Исследование кинетики ренатурации ДНК в различных условиях и разными методами дало возможность сделать вывод, что данный процесс является реакцией второго порядка, причем наблюдаются следующие закономерности, определяемые свойствами ДНК [109, 184, 198, 199, 366].

Для данной ДНК уменьшение ее молекулярного веса путем дробления сопровождается [184] уменьшением константы скорости ренатурации k_2, так что последняя все время остается пропорциональной корню квадратному из длины молекулы L (длина здесь определяется как среднее число нуклеотидов в одноцепочечном полинуклеотиде): $k_2 \approx \sqrt{L}$.

Сопоставление скорости ренатурации одинаковых по длине фрагментов, полученных из ДНК разной сложности, приводит к выводу, что скорость ренатурации обратно пропорциональна сложности [184, 197, 366]. Это обстоятельство дает принципиальную возможность определять сложность молекулы, т. е. для вирусных и бактериальных ДНК — молекулярный вес [184], по кинетике ренатурации деградированных образцов ДНК, исходя из известной (например, определенной по константе седиментации) длины одноцепочечных фрагментов. Таким образом, при одинаковой длине ренатурирую-

---

* Описываемые опыты были одним из первых адекватных доказательств разделения цепей ДНК в результате денатурации.

щих фрагментов различные ДНК могут быть расположены по скорости ренатурации в ряд:

ДНК фагов и вирусов > ДНК бактерий ≫ ДНК животных (медленный компонент, см. ниже)

Сопоставление наблюдаемых констант скорости ренатурации для денатурированных ДНК разного происхождения приводится в табл. 4.13. Общее выражение для константы скорости второго порядка, таким образом, дается формулой

$$k_2 \approx \frac{\sqrt{L}}{N}$$

где L — средняя длина одноцепочечного полинуклеотида; N—сложность нативной молекулы ДНК.

Таблица 4.13. **Зависимость скорости ренатурации от среднего молекулярного веса денатурированных ДНК и от сложности нативной ДНК** [184]

Источник ДНК	Содержание пар гуанин·цитозин, %	Константа седиментации денатурированных ДНК при pH 13 $S_{20, W}$	k_2, $\frac{л}{моль \cdot сек}$	Мол. вес нативной ДНК (из k_2)
Асцитный рак крысы	42	6,8	0,0026	$(2{,}5 \pm 0{,}5) \cdot 10^{12}$
Escherichia coli	50	12,3	6,0	$(2{,}5 \pm 0{,}5) \cdot 10^{9}$
Фаг Т4	34	28 5 8,0	190 39	$(1{,}3 \pm 0{,}10) \cdot 10^{8}$
Фаг № 1	64	30 7,9	1490 330	$(3{,}3 \pm 0{,}15) \cdot 10^{7}$
Фаг Т7	49	34,7 7,5	1790 320	$(2{,}5 \pm 0{,}1) \cdot 10^{7}$
Вирус SV 40	41	6,6	1080	$(3{,}3 \pm 0{,}1) \cdot 10^{6}$

Скорость ренатурации зависит от нуклеотидного состава ДНК, она несколько увеличивается при увеличении содержания пар гуанин · цитозин [184, 366]. Если исходная нативная ДНК содержит повторяющиеся последовательности, то при ее деградации до фрагментов, примерно соответствующих длине такой последовательности, концентрация подобных фрагментов превышает концентрацию каждого из фрагментов с уникальной последовательностью во столько раз, сколько раз повторяющаяся последовательность представлена в ДНК. В связи с этим ренатурация денатурированных ДНК высших организмов носит сложный характер и включает быстрые стадии, когда происходит ренатурация более многочислен-

ных повторяющихся последовательностей, и медленные стадии — для уникальных последовательностей. Кинетика ренатурации, таким образом, может использоваться для детектирования повторяющихся последовательностей [365, 369].

Теоретическое рассмотрение кинетики процесса ренатурации основывается на следующих положениях.

Первым этапом, который определяет скорость процесса, является образование «ядра», представляющего собой одну или несколько пар оснований, соответствующих парам, присутствовавшим в нативной молекуле. Возникновение такого «ядра» (или «ядер») может происходить на одном или нескольких определенных участках денатурированной молекулы. После возникновения «ядра» протекает быстрый процесс образования двойной спирали.

Можно показать, что константа скорости ренатурации определяется формулой

$$k_2 = \beta^3 k_N L/N$$

где β — отношение числа нуклеотидов, могущих быть компонентами образующегося «ядра», к общему числу нуклеотидов в нативной молекуле; k_N — константа скорости образования одного из ядер.

Расхождение предсказаний теории и экспериментальных данных по зависимости скорости ренатурации от длины молекулы связано, возможно, с тем, что вследствие клубкообразного характера денатурированных молекул на все потенциальные ядра образуются с одинаковой скоростью, так как часть из них «спрятана» внутри клубка.

В отдельных цепях денатурированной ДНК возможно образование спирализованных участков за счет взаимодействия комплементарных оснований, расположенных в разных местах цепи [359, 367, 368]. Количество и стабильность таких участков, естественно, увеличивается с понижением температуры и повышением ионной силы среды [367, 198]. Образование подобных участков может влиять на образование «ядер», уменьшая скорость ренатурации, и на процесс последующей спирализации. Если взаимодействуют две цепи со стабильными спиральными участками, может произойти лишь частичная ренатурация. Во взаимодействующих цепях при этом могут остаться участки, способные к образованию новых «ядер» с другими цепями, в результате чего в конечном итоге возможно образование разветвленных агрегатов из многих цепей [367]. Поэтому ренатурацию важно проводить в условиях, в которых образование внутренних двухспиральных участков сведено к минимуму, тогда как двухцепочечная структура еще достаточно прочна.

Воздействие внешних условий. Зависимость константы скорости ренатурации ДНК от температуры имеет максимум * при темпе-

* См., однако, [366].

ратуре порядка $T_m - 25°$ С [109, 184]; точное положение этого максимума зависит от прочих условий, в частности от ионной силы среды [368].

В интервале pH 5—9 скорость ренатурации не зависит от значения pH; при более низких и более высоких значениях pH скорость ренатурации понижается вследствие ионизации оснований.

В зависимости от температуры, при которой проводится ренатурация, ионная сила среды различным образом влияет на скорость процесса [368]. При достаточно высоких температурах (60—80° С), когда в цепях денатурированной ДНК практически нет внутримолекулярных двухспиральных участков, скорость ренатурации монотонно возрастает с увеличением ионной силы [366, 368]. В условиях, при которых эти спиральные участки достаточно прочны (при 25—36° С), зависимость от ионной силы носит сложный характер. При увеличении концентрации соли скорость ренатурации сначала увеличивается за счет экранирования зарядов фосфатных групп и уменьшения отталкивания между цепями. Затем в момент, когда степень внутримолекулярной спирализации равна примерно половине максимально возможной, скорость ренатурации проходит через максимум и далее падает [368]. При ионной силе, отвечающей максимуму внутримолекулярной спирализации в цепях, скорость реакции падает до минимума и при дальнейшем увеличении концентрации солей возрастает [368]. При температурах, применяемых для ренатурации (50—60° С), оптимальной концентрацией соли является примерно 0,4 *М*. При высоких ионных силах среды может измениться даже порядок реакции.

Наконец, константа скорости ренатурации обратно пропорциональна вязкости среды [184, 198, 199] при постоянном значении разности между T_m ДНК и температурой ренатурации.

В итоге для практических целей оптимальными являются следующие условия ренатурации: температура на 25° С ниже T_m данной ДНК; ионная сила 0,4; pH раствора в интервале 5—9.

Причины наблюдаемой зависимости скорости ренатурации от температуры и вязкости в настоящее время являются предметом обсуждения [184, 366].

Взаимодействие денатурированных ДНК с комплементарными цепями РНК протекает, по-видимому, по такому же механизму и с такими же закономерностями [200, 364, 370—372].

Образование стабильной двухспиральной структуры при взаимодействии комплементарных цепей широчайшим образом используется в молекулярной биологии для установления генетического сродства различных микроорганизмов, для определения происхождения различных видов РНК в цитоплазме клеток и, наконец, для локализации некоторых видов мутаций в цепи ДНК. Во всех этих исследованиях экспериментатора интересует не восстановление структуры исходной денатурированной ДНК, а образование сме-

шанных, гибридных молекул путем соединения двух комплементарных цепей ДНК, принадлежащих различным организмам, или изучаемых ДНК и РНК. Для ренатурации с образованием гибридных молекул применяют термин «гибридизация» [109, 201–211].

Описанные методы ренатурации в водных растворах требуют применения довольно высоких температур (порядка $T_m - 25°$ С), что приводит к деградации нуклеиновых кислот в процессе ренатурации. Если проводить ренатурацию в присутствии веществ, понижающих стабильность двойной спирали, например органических растворителей [373–375] или мочевины [376], то, подобрав соответствующую концентрацию денатурирующего агента и величину ионной силы, удается провести высокоспецифичную ренатурацию достаточно быстро и при сравнительно низкой температуре.

В итоге, исходя из исследований по денатурации и ренатурации ДНК, можно заключить, что в определенных условиях двухспиральная структура ДНК типа Уотсона—Крика более стабильна, чем ее разделенные одноцепочечные компоненты.

2. Внутримолекулярные взаимодействия в ДНК

Особенности поведения ДНК в растворе определяются взаимодействием между основаниями, влиянием растворителя и электростатическими эффектами фосфатных групп. Типы взаимодействий между основаниями и межплоскостные взаимодействия между парами оснований, связанных водородными связями, уже были рассмотрены. Структура ДНК очень компактна, и пространство между основаниями непроницаемо для молекул воды; гидратная оболочка образуется вокруг внешней поверхности двойной спирали ДНК. Поскольку величина внешней поверхности двухспиральной молекулы ДНК, которую приближенно можно рассматривать как цилиндр с радиусом 10 Å, значительно меньше величины поверхности одноцепочечных молекул, образующихся при денатурации, то, согласно теории Синаноглу (см. стр. 248), двухспиральное состояние должно быть значительно более выгодным, чем односпиральное, с точки зрения влияния растворителя на свободную энергию системы.

Помимо взаимодействия оснований и эффектов растворителя очень важным фактором, влияющим на стабильность двухспиральной молекулы, является взаимодействия зарядов фосфатных групп. В нативной ДНК эти взаимодействия происходят как между зарядами соседних фосфатных групп в одной цепи, так и между зарядами групп в противоположных цепях двухспирального комплекса. В денатурированном состоянии сохраняются только взаимодействия фосфатных групп внутри одной цепи. Расстояние между соседними фосфатными группами в одной цепи спирали Уотсона и Крика (7 Å) соответствует почти максимальному расстоянию, на котором они могут находиться. В денатурированном состоянии

соседние фосфатные группы также находятся на максимально возможном расстоянии друг от друга, по-видимому, вследствие отталкивания отрицательных зарядов. Поэтому взаимодействие соседних фосфатных групп одной цепи и в нативном, и в денатурированном состоянии должно быть примерно одинаковым и не должно оказывать существенного влияния на различие в стабильности этих двух состояний. Однако взаимодействие между удаленными фосфатными группами, принадлежащими одной и той же цепи, может быть различным в нативном и денатурированном состояниях вследствие различия конформаций двухспиральной и односпиральной молекул. Если же этим эффектом пренебречь, то следует принять, что основным различием между двумя состояниями является отсутствующее в одноцепочечном полинуклеотиде взаимодействие между фосфатами, принадлежащими противоположным цепям двухспиральной структуры. Основываясь на этом, можно рассчитать электростатический потенциал, создаваемый в точке нахождения любой фосфатной группы одной цепи всеми зарядами фосфатов другой цепи, а также оценить величину электростатической свободной энергии, обусловленную этим взаимодействием [147, 212-214].

В присутствии солей вследствие изменения экранирования зарядов фосфатных групп за счет ионной атмосферы величина электростатической свободной энергии меняется. Поскольку электростатическая свободная энергия является разностью свободных энергий взаимодействия зарядов фосфатных групп в нативном и денатурированном состояниях ДНК, то изменение этой величины должно сказываться на температуре плавления двухспиральной структуры. Действительно, между рассчитанными для разных значений ионной силы величинами электростатической свободной энергии и соответствующими значениями T_m наблюдается линейная зависимость. Увеличение экранирования фосфатных групп, вызывающее уменьшение свободной энергии взаимодействия между фосфатами, повышает стабильность двухспирального состояния, что приводит к повышению T_m.

Таким образом, если эффекты, связанные с взаимодействием оснований друг с другом и с взаимодействием полинуклеотидов с растворителем, стабилизуют двухспиральную структуру молекулы, то электростатические взаимодействия зарядов фосфатных групп дестабилизуют ее.

Важным вопросом, возникающим в связи с процессом денатурации ДНК, является вопрос о причинах кооперативности перехода в денатурированное состояние. Эта проблема решается в рамках современных теорий перехода спираль — клубок для ДНК, рассматривающих данный процесс с точки зрения статистической физики [146, 215-222, 377-380]. Причиной кооперативности плавления в ДНК являются межплоскостные взаимодействия пар оснований. Если ε есть изменение свободной энергии при межплоскостной

ассоциации двух изолированных, но связанных водородными связями пар оснований, взаимное положение которых соответствует модели Уотсона — Крика, то кооперативность перехода можно охарактеризовать так называемым фактором кооперативности σ:

$$\sigma = e^{-\frac{\varepsilon}{RT}}$$

где R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура в °K.

В случае синтетических гомополинуклеотидов ширина интервала перехода связана с фактором кооперативности соотношением

$$\Delta T_m = 12{,}4R\,\frac{T_m^2}{\Delta H}\,\sigma^{2/3}$$

т. е. пропорциональна $\sigma^{2/3}$ (здесь ΔH — энтальпия перехода спираль — клубок, остальные обозначения известны).

Процесс плавления ДНК, как уже отмечалось, протекает с промежуточным образованием дефектов в двойной спирали, так что в переходном состоянии образуются чередующиеся спиральные и неспиральные участки. Средняя длина спирального участка ν в точке плавления также связана с фактором кооперативности и для двухспиральных синтетических гомополинуклеотидов со случайным распределением вдоль цепи дефектов, возникающих в двойной спирали при плавлении. Эта зависимость выражается так:

$$\nu \approx \frac{1}{\sigma^{2/3}}$$

Для ДНК, несколько отличающейся по механизму плавления от гомополинуклеотидов, дефекты в двойной спирали возникают в первую очередь в местах, богатых пáрами аденин·тимин. Для ширины интервала перехода ДНК имеем:

$$\Delta T_m \approx \frac{1}{|\ln\sigma|} \approx \frac{1}{\varepsilon}$$

Таким образом, из теоретического рассмотрения процесса плавления ДНК вытекает, что с увеличением свободной энергии межплоскостного взаимодействия пар оснований уменьшается ширина интервала перехода и увеличивается число нуклеотидов в спиральных участках в точке перехода.

Свободную энергию межплоскостного взаимодействия пар оснований можно определить из известных экспериментальных данных по определению энтальпии перехода спираль — клубок и ширины интервала перехода. Если принять $\Delta H = 8$ *ккал/моль* [147, 155], то изменение свободной энергии ε при ассоциации составляет примерно 7 *ккал/моль* для двойных спиралей, составленных из синтетических гомополинуклеотидных цепей. Рассчитанные значения ΔT_m хорошо согласуются с экспериментальными величинами

интервала перехода. Согласуется с экспериментом также и вывод, что с уменьшением молекулярного веса ДНК должна уменьшаться величина T_m и увеличиваться ΔT_m.

Заканчивая рассмотрение двухспиральных молекул, следует сказать несколько слов о влиянии макромолекулярной структуры на реакционную способность оснований, входящих в состав этих молекул, по отношению к различным химическим агентам. Общей закономерностью здесь, по-видимому, является резкое снижение скорости реакций по сравнению с мономерами.

В качестве примера можно привести реакцию с формальдегидом, широко применяющуюся для исследований структуры нуклеиновых кислот. Этот реагент, легко реагируя с основаниями в составе нуклеозидов и нуклеотидов, практически не реагирует с ДНК [223]. Аналогичные эффекты наблюдаются для таких реагентов, как карбодиимид [224, 225], семикарбазид [226] и т. д. Более детально для разных реагентов этот вопрос рассматривается во второй половине книги. Сейчас пока трудно дать точное определение всех факторов, вызывающих подобное снижение реакционной способности, однако, вне всякого сомнения, большую роль здесь играют пространственные факторы, связанные с упаковкой оснований внутри двойной спирали, а также энергетические факторы, когда реакция проходит по атому, принимающему участие в системе водородных связей.

В этой связи необходимо отметить, что ДНК в растворах представляет собой не статическую, раз навсегда закрепленную структуру, а динамическую, непрерывно испытывающую локальные денатурации и ренатурации [227]. Этим, по-видимому, и объясняется возможность протекания ряда химических реакций с группами оснований, расположенными внутри упаковки двойной спирали. В частности, это относится к обмену протонов ДНК, принимающих участие в образовании водородных связей, на дейтерий и тритий [97, 98, 228, 341], а также к реакции с формальдегидом [381]. Вероятность локальной денатурации и, следовательно, скорость химической реакции уменьшаются с увеличением степени кооперативности двухспиральной молекулы.

VIII. ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

Природные полинуклеотиды не в денатурированном состоянии не обладают односпиральной конформацией. Они либо двухспиральны, как ДНК, либо включают в себя двухспиральные участки, чередующиеся с односпиральными, как РНК. Поэтому для понимания свойств одноцепочечных РНК необходимы модельные соединения, представляющие собой практически односпиральные молекулы, на основании свойств которых можно было бы сделать выводы о свойствах односпиральных участков РНК. Такими модельными соединениями являются синтетические гомополинук-

леотиды — полиадениловая и полицитидиловая кислоты в нейтральной и щелочной средах * и полиуридиловая кислота ** (обзор — см.[100]).

Несмотря на то что по гидродинамическим свойствам полиадениловая и полицитидиловая кислоты в нейтральных и щелочных средах представляют собой статистические клубки[229-232], наличие гипохромного эффекта[57, 60, 232, 233], кругового дихроизма[71, 234, 235] и дисперсии оптического вращения[62, 236, 237] свидетельствует о том, что между основаниями в этих полинуклеотидах существуют взаимодействия. Кривые дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма очень схожи с аналогичными кривыми для динуклеозидмонофосфатов (см. стр. 238), и это дает основание предположить, что в случае гомополимера водородные связи между основаниями не образуются. Расчеты кривых дисперсии оптического вращения для полиадениловой и полицитидиловой кислот,[238] выполненные исходя из свойств динуклеозидфосфатов, дают результаты, согласующиеся с экспериментальными ***. Наиболее прямыми доказательствами односпиральной структуры этих полинуклеотидов является аналогия их свойств со свойствами полинуклеотидов, у которых невозможно образование водородных связей в силу замещения соответствующих водородов алкильными радикалами[71, 239, 240], а также результаты кинетических исследований реакции с формальдегидом[241].

Причиной различия оптических свойств гомополинуклеотидов и изолированных мономерных единиц являются межплоскостные взаимодействия между соседними основаниями, приводящие к заторможенности хромофорных групп оснований относительно друг друга. Этот эффект наблюдается уже на уровне динуклеозидмонофосфатов (см. стр. 236). При повышении температуры происходит постепенное изменение оптических свойств гомополинуклеотидов, носящее некооперативный характер[57, 70]. На рис. 4.20 в качестве примера показано изменение величины силы вращения положительной полосы кругового дихроизма олигоаденилатов различной длины с повышением температуры.

Анализ кривых приводит к выводу, что значения T_m, а также изменения энтальпии, энтропии и свободной энергии олигоадени-

---

* В кислой среде эти полинуклеотиды образуют двухспиральные комплексы[100].

** Структура полигуаниловой кислоты в настоящее время еще недостаточно выяснена[100].

*** В случае дезоксиполинуклеотидов подобные расчеты не приводят к согласию с экспериментальными данными[310]. Это связано, по-видимому, с так называемым концевым эффектом: нуклеозидные звенья, находящиеся на концах и внутри цепи, в разной степени взаимодействуют с водой. Причины различий между рибо- и дезоксирибоолиго- и полинуклеотидами не ясны[76, 340].

Интересно отметить, что 2′-O-метилрибоолиго-[340] и 2′-O-метилрибополинуклеотиды[382] по свойствам ближе к рибо-, чем к дезоксирибопроизводным.

латов при переходе от состояния, в котором основания взаимодействуют, к состоянию, где (судя по оптическим свойствам) такого взаимодействия нет, примерно одинаковы независимо от длины цепи [57, 70].

Эти результаты подтверждаются данными по гипохромному эффекту и дисперсии оптического вращения [57, 60, 77, 242]. Хотя так же, как в случае ApA (см. стр. 246), величины термодинамических параметров отличаются при определении различными методами, общий вывод о их независимости от длины цепи остается неизменным. Это означает, что свободная энергия присоединения одного основания к уже существующей последовательности упорядоченных оснований равна свободной энергии возникновения взаимодействия между двумя основаниями при отсутствии предварительной упорядоченности. Следовательно, константа равновесия между взаимодействующими и невзаимодействующими основаниями в динуклеотиде равна соответствующей константе равновесия в полимере. Такое положение типично для некооперативных взаимодействий и существенно отличает их от кооперативных (см. стр. 281). С точки зрения макромолекулярной структуры это означает, что в односпиральных полинуклеотидах в каждый данный момент существуют только короткие последовательности уложенных в стопку оснований, между которыми находятся области невзаимодействующих компонентов, причем упорядоченные области непрерывно разрушаются и образуются случайным образом вдоль полинуклеотидной цепи. Это является первой и основной отличительной особенностью вторичной структуры односпиральных полинуклеотидов; в двухспиральных полинуклеотидах взаимодействие между соседними пáрами оснований значительно более стабильно.

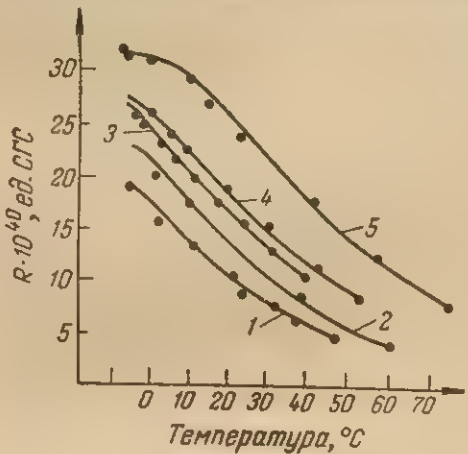


Рис. 4.20. Изменение силы вращения положительной полосы растворов олигоаденилатов различной длины с увеличением температуры при pH 7,4 [70]:

1 — $(A)_3$; 2 — $(A)_5$; 3 — $(A)_7$; 4 — $(A)_{12}$; 5 — $(A)_n$ $(n > 50)$.

Средняя длина упорядоченных участков в одноцепочечных полинуклеотидах увеличивается с понижением температуры. Так, при 20° С в спиральных областях содержится примерно $^2/_3$ общего количества оснований, а при 0° С — уже $^7/_8$ всех оснований. Это приводит к изменению конформации всей молекулы, что проявляется, например, в быстром увеличении вязкости [100].

Вторым существенным отличием односпиральных полинуклеотидов является независимость температуры плавления, определяе-

мой по изменению оптических характеристик, от ионной силы среды[57], начиная с $\mu = 0{,}01$ и выше. Это является, по-видимому, следствием максимально возможной удаленности соседних фосфатных групп как в том случае, когда соответствующие основания уложены в стопку, так и в том случае, когда между ними нет взаимодействия (аналогично положению внутри одной цепи двухспиральной молекулы — см. выше). Переход от упорядоченного к беспорядочному состоянию не должен зависеть от электростатических взаимодействий. Наконец, реакционная способность односпиральных полинуклеотидов значительно выше, чем у двухспиральных молекул. Это является следствием значительно большей доступности реакционноспособных групп в односпиральных молекулах.

Таким образом, свойства односпиральных полинуклеотидов существенно отличаются от свойств двухспиральных молекул. В молекулах РНК, где содержатся в одной цепи все четыре типа оснований, как будет показано ниже, имеются и двухспиральные, и односпиральные области, в результате чего свойства этих соединений во многом носят промежуточный характер между двумя рассмотренными выше случаями. Особенно заметно это проявляется в реакционной способности по отношению к различным химическим агентам.

Свойства рибонуклеиновых кислот будут рассмотрены на примере двух классов этих соединений, для которых в настоящее время в ряде случаев известна первичная структура, а именно: транспортных РНК и 5S рибосомальных РНК. Свойства более высокомолекулярных рибонуклеиновых кислот во многом аналогичны, однако их вторичная структура в настоящее время не может обсуждаться на уровне конкретных моделей, поскольку неизвестна последовательность оснований в их полинуклеотидной цепи (обзор — см.[243, 388]).

1. Вторичная структура тРНК

Как уже отмечалось (см. гл. I), тРНК представляют собой, по-видимому, наиболее короткие из известных до сих пор природных полинуклеотидов. Кроме того, они отличаются от других полинуклеотидов наличием большего количества редких компонентов. Эти два обстоятельства позволили установить для ряда тРНК первичную структуру, что, в свою очередь, дало возможность построить конкретные модели их вторичной структуры. Однако еще до установления последовательности нуклеотидов был сделан ряд выводов о некоторых общих чертах вторичной структуры тРНК (обзор — см. [244, 245]).

Форма молекулы тРНК в растворе. Температурные переходы. При повышении температуры растворов тРНК наблюдается уве-

личение оптической плотности при 260 *ммк* [246–249] и уменьшение оптического вращения [250]. Плавление макроструктуры в присутствии одновалентных катионов носит слабо выраженный кооперативный характер, и ширина интервала ΔT_m составляет около 40° С. Величина T_m для различных тРНК меняется в зависимости от ионной силы среды. Например, для суммарной тРНК из дрожжей в 0,001 *М* фосфатном буфере (pH 6,7) T_m равна 50° С, а в 1 *м* NaCl — около 65° С (рис. 4.21). Наблюдаемый гиперхромный эффект имеет величину 23—28% и полностью обратим, исчезая при охлаждении [246, 247] (даже при быстром охлаждении [149], когда двухспиральные полинуклеотиды не ренатурируют). В присутствии двухвалентных ионов характер плавления тРНК меняется: значительно повышается T_m и сужается интервал плавления. Так, T_m суммарной дрожжевой тРНК в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ *М* хлористого магния повышается до 72° С, и 75% общего гипохромного эффекта наблюдается в интервале 10° С. Для различных индивидуальных тРНК значения T_m и ее изменения при добавлении ионов магния различны, однако общей тенденцией здесь является возрастание T_m с увеличением содержания гуанина и цитозина и с увеличением ионной силы среды, а также усиление кооперативности перехода в присутствии ионов магния.

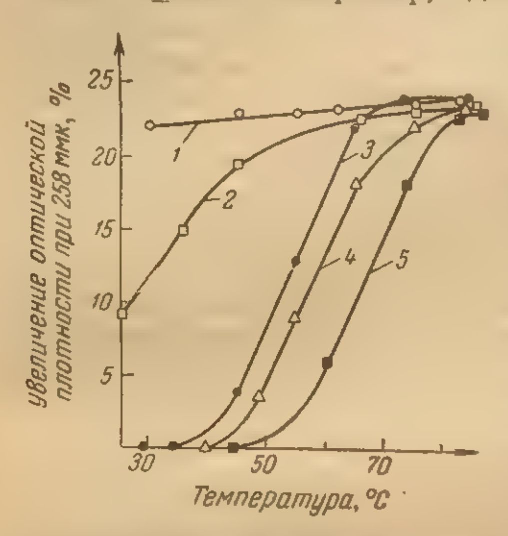


Рис. 4.21. Температурное изменение оптической плотности растворов тРНК при различных значениях ионной силы среды [246]:

1 — раствор тРНК в воде; 2 — в 6 *М* растворе мочевины; 3 — в 0,001 *М* фосфатном буфере, pH 6,7; 4 — в 0,1 *М* растворе NaCl; 5 — в 1 *М* растворе NaCl.

Выраженная зависимость T_m от ионной силы раствора существенно отличает тРНК от односпиральных гомополинуклеотидов. Это обстоятельство дает основание предполагать наличие в молекуле тРНК двухспиральных участков с основаниями, связанными по типу структуры Уотсона и Крика. Такая точка зрения находит подтверждение в различии реакционной способности оснований, входящих в состав тРНК, по отношению к некоторым химическим агентам. После быстрой реакции какого-либо реагента с молекулой тРНК наблюдается значительно более медленная стадия, причем анализ показывает, что по окончании быстрой стадии в реакцию вступает лишь часть потенциально-реакционноспособных оснований, определенная для данных условий эксперимента. Если предположить, что быстро реагирующие основания расположены в односпиральных, а медленно реагирующие — в двухспиральных

участках, то таким путем можно оценить степень спирализации всей молекулы полинуклеотида.

Данные по взаимодействию тРНК с формальдегидом [251–255] в присутствии Mg^{2+} и по способности к обмену водородных атомов тРНК с ^3H_2O [228] привели к заключению, что примерно 70—75% оснований молекулы принимает участие в образовании комплементарных пар.

Различная активность оснований в составе тРНК была зафиксирована также при модификации ее перфталевой кислотой [257], которая реагирует в присутствии Mg^{2+}, окисляя всего 10% адениновых остатков от их общего количества на молекулу тРНК. Акрилонитрил в 0,5 *М* растворе хлористого натрия после превращения 2,2% содержащегося в тРНК псевдоуридина практически дальше не реагирует с основаниями [258]. Избирательно действует и гидроксиламин в щелочной среде [259], модифицируя при низкой температуре (~10° С) лишь 25% урациальных остатков от общего содержания урацила в тРНК. Вместе с тем при повышении температуры реакции до 40° С превращению подвергаются практически все урацильные нуклеотиды (см. стр. 470). Кроме того, двухспиральные и односпиральные участки цепи тРНК обладают различной чувствительностью к действию РНК-аз, которые, как известно [256], расщепляют двухспиральные полирибонуклеотиды со значительно меньшей скоростью, чем односпиральные.

Исследования с использованием синтетических полинуклеотидов, и в частности опыты по комплексообразованию между полиуридиловой кислотой и сополимером адениловой и уридиловой кислот, привели к выводу о возможности существования комплексов, обладающих дефектами в двойной спирали. Такие дефекты представляют собой неспиральные участки, в которых друг против друга располагаются некомплементарные основания [260]. Применение этих представлений к гипотетической РНК, обладающей случайной последовательностью оснований, привело к выводу, что для случайной последовательности из 90 нуклеотидов можно построить структуры с 60% оснований, связанных водородными связями [260]. Это примерно совпадает с оценкой, полученной химическими методами. В свете представлений о спиральной с дефектами структуре РНК степень спирализации можно, помимо того, определить, основываясь на данных по изменению оптической плотности при разных длинах волн с повышением температуры растворов тРНК. Очевидно, что повышение оптической плотности при плавлении вторичной структуры связано с тремя основными эффектами: разрушением пар типа гуанин·цитозин, разрушением пар типа аденин·урацил и нарушением межплоскостных взаимодействий между основаниями в неспиральных участках. В первом приближении можно принять, что все три эффекта вносят независимый вклад в изменение свойств тРНК при плавлении вторичной структуры.

Оценка изменений УФ-спектра тРНК, происходящих при разрушении пар оснований, может быть произведена по данным плавления синтетических двухспиральных полинуклеотидных комплексов (поли-А) · (поли-U) и (поли-G) · (поли-С). Характеристикой изменений является разность в экстинкциях между денатурированной и спиральной формами при различных длинах волн [261, 262] — так называемый спектр денатурации (рис. 4.22).

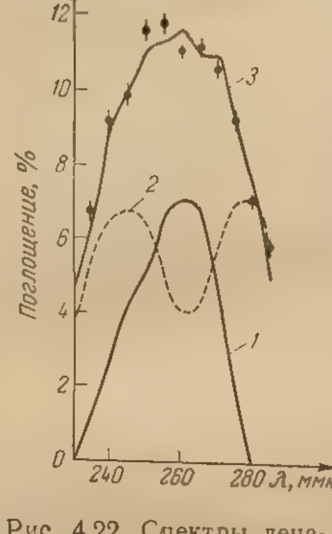


Рис. 4.22. Спектры денатурации полинуклеотидов, полученные вычитанием спектра при 0° С из спектра при 100° С[262]:

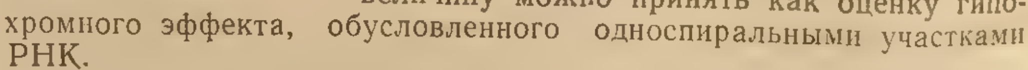
1 — двухспиральный комплекс (поли-А)·(поли-U); *2* — двухспиральный комплекс (поли-G)·(поли-С); *3* — тРНК из дрожжей.

Легко видеть, что при 255 и 270 *ммк* вклад в изменение спектра от разрушения пар аденин · урацил и гуанин · цитозин при денатурации одинаков, в результате чего при денатурации изменение оптической плотности тРНК в этих точках не должно зависеть от нуклеотидного состава РНК.

Гипохромный эффект при 255 *ммк*, вызванный разрушением пар оснований, может быть оценен по данным плавления двухспиральных комплексов (поли-А)·(поли-U) и (поли-G) · (поли-С). Процентная гипохромия при изменении температуры растворов от 15 до 85° С для обеих пар оснований при 255 *ммк* примерно одинакова и составляет 30% [263].

Сложнее оценить гипохромный эффект, обусловленный плавлением односпиральных областей. В случае РНК, обработанной формальдегидом [263], когда образование пар оснований исключено, процентная гипохромия составляет 4—6% (табл. 4.14). Эту величину можно принять как оценку гипохромного эффекта, обусловленного односпиральными участками РНК.

Если через x обозначить долю нуклеотидов в двухспиральных участках, через $h_т$ — процентную гипохромию нативной РНК, через $h_д$ — процентную гипохромию, обусловленную плавлением двухспиральных областей, через $h_{од}$ — обусловленную плавлением односпиральных областей, то при допущении независимости $h_д$ и $h_{од}$ можно записать:



$$h_т = x h_д + (1 - x) h_{од}$$

Используя значения, приведенные в табл. 4.14 для $h_т$ и $h_{од}$, и принимая $h_д$ равной 30%, можно вычислить x. Для тРНК эта величина оказывается порядка 59—63%. Если пренебречь плавлением односпиральных участков, то соответствующие величины возрастают до 65—70%. Эти весьма приближенные оценки тем не

менее дают то же значение степени спирализации, что и химические методы.

Предварительные рентгеноструктурные данные[389-392], полученные на кристаллических препаратах тРНК, приготовление которых (см., например,[389-392]) стало возможным в последнее время, свидетельствуют о наличии в кристаллических образцах тРНК двухспиральных областей.

Таблица 4.14. **Гипохромные эффекты нативных и обработанных формальдегидом РНК** [263]

Полинуклеотид	Процентная гипохромия, %	
	нативная РНК	РНК, обработанная формальдегидом
тРНК из *Escherichia coli*	19,5	4,5
тРНК из дрожжей	21	6
РНК фага R17	23	4,5
РНК вируса табачной мозаики (ВТМ)	21	4

Итак, совокупность различных методов приводит к выводу о значительной степени спирализации тРНК*. Априорно можно предполагать достаточно много способов такой организации молекулы РНК, чтобы в ней были двухспиральные участки[260]. На рис. 4.23 приведено несколько возможных способов укладки молекулы аланиновой тРНК из дрожжей (обсуждение — см. стр. 291).

Некоторую конкретность в вопрос о вторичной структуре тРНК вносят данные по расщеплению молекулы фосфодиэстеразами в присутствии ионов магния[264-266]. В результате отщепляется только общий для всех молекул тРНК 3′-концевой тринуклеотид pCpCpA; дальнейшее расщепление не происходит. Этот факт свидетельствует, очевидно, о том, что указанный 3′-концевой тринуклеотид не принимает участия в образовании макроструктуры тРНК. В отличие от других полирибонуклеотидов тРНК не до конца расщепляется полинуклеотидфосфорилазой в присутствии Mg^{2+}, что, повидимому, также свидетельствует о большой степени структурирования тРНК в этих условиях[244]. Значительно большую конкретность вопрос о макроструктуре тРНК приобрел после того, как были установлены последовательности нуклеотидов в ряде молекул индивидуальных тРНК[267-276, 290].

Модели вторичной структуры тРНК. Для первой индивидуальной тРНК, первичная структура которой была полностью расшиф-

* Спектры денатурации РНК позволяют также приближенно оценить содержание пар гуанин·цитозин и аденин·урацил в двухспиральных участках, если пренебречь малым вкладом, вносимым в спектры односпиральными участками[261].

а

б

в

Рис. 4.23. Возможные схемы вторичной структуры аланиновой тРНК из дрожжей[267]:

а — одношпилечная модель; *б* — двушпилечная модель; *в* — модель „клеверный лист" (римскими цифрами обозначены отдельные петли структуры)

Рис. 4.23. Возможные схемы вторичной структуры аланиновой тРНК из дрожжей [267]:

а – одноцепочечная модель; *б* – двухцепочечная модель; *в* – модель „клеверный лист" (римскими цифрами обозначены отдельные петли структуры)

Рис. 4.23. Возможные схемы вторичной структуры аланиновой тРНК из дрожжей [267]:

а — одношпилечная модель, *б* — двушпилечная модель; *в* — модель „клеверный лист" (римскими цифрами обозначены отдельные петли структуры)

рована, — аланиновой тРНК[267] — на основании принципа необходимости максимально возможного числа спаренных оснований были предложены три вероятные структуры (см. рис. 4.23).

Две из этих структур соответствуют уже предлагавшимся[260] на основании случайной последовательности структурам «шпильки» (*а*) и разветвленной модели (*б*). Конформация (*в*), получившая название «клеверный лист», отличается от ранее предлагавшихся структур (хотя не исключено, что подобная структура может быть построена и для некоторой случайной последовательности нуклеотидов). Неожиданно оказалось, что для всех расшифрованных к настоящему времени молекул тРНК может быть построена структура типа «клеверный лист».

Существует ряд доводов в пользу достоверности структуры типа «клеверный лист» .

1. Результаты расщепления сериновой тРНК из дрожжей[268] панкреатической РНК-азой и гуанил-РНК-азой более согласуются с моделью вторичной структуры типа «клеверный лист», чем со структурой типа «шпилька». Кроме того, в модели «клеверный лист» большее число оснований (по сравнению со «шпилькой») участвует в образовании водородных связей.

2. Химическая модификация аланиновой дрожжевой тРНК действием бромсукцинимида, азотистой кислоты[277] или водорастворимого карбодиимида[278] затрагивает в основном участки, соответствующие петлям в модели «клеверного листа». Следует обратить внимание на отсутствие модификации в петлевом «универсальном» олигонуклеотиде pGpTpΨpC как при действии N-бромсукцинимида, так и при действии карбодиимида. Такой же эффект наблюдается при модификации суммарных препаратов тРНК акрилонитрилом[279], что говорит в пользу одинаковой труднодоступности этого олигонуклеотида во всех тРНК. В настоящее время трудно судить, связана ли такая дифференциация свойств нуклеотидов, находящихся в петлевых участках, с некорректностью предлагаемой вторичной структуры или с существованием третичной структуры у тРНК (см. ниже). Возможно, еще одним доводом, уже не экспериментального характера, может служить то обстоятельство, что структура «клеверного листа» дает возможность расположить антикодонный тринуклеотид, олигонуклеотиды с остатками дигидроуридина и «универсальную» нуклеотидную последовательность pGpTpΨpC в одинаковых петлевых участках различных тРНК. Не исключено, что универсальная вторичная структура с универсальным расположением гомологичных последовательностей имеет непосредственную связь с одинаковой ролью различных тРНК в процессе биосинтеза белка.

Анализ физико-химических свойств половинок молекул, получающихся при расщеплении гуанил-РНК-азой T_1 и панкретической РНК-азой молекул аланиновой и валиновой тРНК из дрожжей в

условиях, когда вторичная структура тРНК максимально стабилизована, приводит к выводу [280, 281], что эти тРНК в данных условиях имеют двухшпилечную конфигурацию типа структуры *б*, изображенной на рис. 4,23. Кроме того, расчетным путем было показано, что для аланиновой тРНК из дрожжей структура, содержащая максимальное число водородно-связанных пар оснований, лучше отвечает двухшпилечной модели [282].

Однако для ряда тРНК двухшпилечная модель опровергается данными по ассоциации половинок молекулы с образованием комплекса, близко соответствующего по физико-химическим свойствам интактной тРНК (см., например,[283, 383–385]). Более того, такой комплекс обладает акцепторной активностью, близкой к активности интактной тРНК [283]. Образование комплекса между половинками происходит, по-видимому, за счет образования водородных связей, что согласуется с одношпилечной моделью или с моделью «клеверного листа» (в которых половинки связаны между собой), но не с двухшпилечной моделью, все водородные связи которой сосредоточены внутри половинок.

Дисперсия оптического вращения. Некоторую дополнительную информацию о вторичной структуре тРНК можно получить, используя данные по дисперсии оптического вращения [238, 284]. Основываясь на некооперативном характере межплоскостного взаимодействия оснований, из известных данных по дисперсии оптического вращения 16 возможных динуклеозидмонофосфатов (имеются в виду обычные нуклеозиды) [56, 236] и мононуклеотидов, можно рассчитать дисперсию оптического вращения РНК, не обладающей никакой иной вторичной структурой, кроме определяемой межплоскостными взаимодействиями. Расчеты такого рода, проведенные для полиадениловой, полицитидиловой и полиуридиловой кислот, дают удовлетворительное совпадение с экспериментальными данными, полученными в условиях, когда эти полинуклеотиды существуют в односпиральной конформации [238]. Однако подобные же расчеты для тРНК дают картину, резко отличающуюся от экспериментальной, что связано, по-видимому, со значительным вкладом пар оснований во вторичную структуру тРНК.

Задавшись определенной моделью вторичной структуры тРНК с определенным содержанием комплементарных пар аденин · урацил и гуанин · цитозин, можно рассчитать соответствующую этой модели дисперсию оптического вращения, если известны изменения, вносимые в картину дисперсии односпиральной молекулы при образовании пар оснований. Величину этих изменений можно приближенно оценить, сопоставляя кривые дисперсий оптического вращения двухспиральных комплексов (поли-A) · (поли-U) и (поли-G) · (поли-C) и односпиральных молекул поли-A, поли-U, поли-G и поли-C [285, 286]. Такое сопоставление, вообще говоря, дает принципиальную возможность выбора наиболее вероятных типов

укладки вторичной структуры. Однако расчеты подобного рода, проведенные для трех типов вторичной структуры, предложенных для аланиновой тРНК из дрожжей (см. стр. 290), дают практически одну кривую. По-видимому, это связано с большой неточностью допускаемых приближений. Наилучшее совпадение с экспериментальными данными по дисперсии оптического вращения дает модель аланиновой тРНК, представляющая собой несколько видоизмененный (по сравнению в предложенным Холли[267]) «клеверный лист», имеющий максимально возможное число водородно-связанных пар[238]. Но вполне удовлетворительные результаты получаются и при сопоставлении экспериментальных кривых с рассчитанными при использовании оригинальных моделей «клеверного листа» для аланиновой и тирозиновой тРНК из дрожжей[284].

Таким образом, имеющиеся данные по дисперсии оптического вращения дают дополнительные подтверждения образования водородно-связанных участков в молекуле тРНК *, но они не дают возможности правильно выбрать тип вторичной структуры.

ИК-Спектры. Межплоскостные взаимодействия между основаниями в полинуклеотидах мало сказываются на ИК-спектрах, тогда как образование водородно-связанных пар приводит к появлению[96, 97, 386, 387, 393 395] характеристических пиков в области 1500—1700 *см*$^{-1}$. В ИК-спектре формилметиониновой тРНК из *E. coli* в D_2O при 33° С в области 1450—1750 *см*$^{-1}$ наблюдается семь максимумов адсорбции, обусловленных поглощением пар аденин · урацил и гуанин · цитозин, а также нуклеотидных звеньев, не участвующих в образовании пар[386]. При повышении температуры понижается поглощение при 1686 *см*$^{-1}$ и повышается поглощение при 1651 *см*$^{-1}$, что связано с разрушением пар оснований. Профиль плавления в ИК-спектре такой же, как при 260 *ммк* в УФ-области. Максимум при 1620 *см*$^{-1}$, соответствующий поглощению аденилового звена в полинуклеотиде, не меняется вплоть до 97° С; это означает, что адениловые звенья в малой степени участвуют в образовании водородно-связанных пар. Исходя из значений молярного коэффициента экстинкции свободных нуклеотидных звеньев и звеньев, связанных водородными связями, при различных длинах волн [определены по данным для нуклеотидов и комплексов (поли-A) · (поли-U) и (поли-G) · (поли-C) соответственно], можно рассчитать ИК-спектры тРНК, отвечающие различным схемам спаривания[386]. Наилучшее совпадение с экспериментальным спектром формилметионовой тРНК из *E. coli* получено при использовании

---

* Сопоставление расчетных и экспериментальных данных может служить очень полезным методом детектирования двухспиральных участков в молекулах одноцепочечных полинуклеотидов, ибо экспериментальные кривые для одноцепочечных молекул с двухспиральными участками сильно сдвинуты в сторону коротких волн по сравнению с кривыми, рассчитанными для односпиральных полинуклеотидов.

модели типа «клеверный лист»[274]. Аналогичное сопоставление расчетных и экспериментальных данных для фрагмента, соответствующего антикодоновой петле этой тРНК[387], также показывает совпадение для схемы спаривания по типу модели «клеверного листа»[274].

Наконец, возможно сопоставление экспериментального профиля плавления тРНК с теоретически рассчитанным, подобно тому как это делается в случае ДНК (см. стр. 281)[396]. Такое сопоставление было проведено для ряда индивидуальных тРНК, и в случае сериновой тРНК из дрожжей показано хорошее совпадение экспериментальных данных с расчетными, полученными на основе модели типа «клеверный лист». Для аланиновой и тирозиновой тРНК из дрожжей обнаружены, однако, значительные расхождения между расчетом и экспериментом. Следует отметить, что расчеты такого рода можно рассматривать лишь как весьма приближенные, поскольку пренебрегают межплоскостными взаимодействиями в неспаренных областях, а также влиянием катионов и третичной структуры на термические переходы тРНК[396].

Подводя итоги, следует сказать, что в настоящее время пока не существует ни одного убедительного доказательства в пользу существования той или другой выдвинутой модели вторичной структуры тРНК. Пользующаяся в настоящее время наибольшей популярностью модель «клеверного листа» также экспериментально мало обоснована.

Исследования тРНК методами двойного лучепреломления, электронной микроскопии, поляризации флуоресценции[251], рентгеновского рассеяния под малыми углами[287, 288] привели к выводу о палочкообразном характере молекул тРНК с размерами 100 Å в длину и 20 Å в ширину. Этот вывод подтверждается также и изучением гидродинамических свойств молекул тРНК[289]. Естественно, что в случае любой разветвленной схемы вторичной структуры необходима еще некоторая надструктура, обусловливающая палочкообразный характер молекулы.

2. Проблема третичной структуры тРНК

Как уже отмечалось, «универсальный» для всех исследованных индивидуальных тРНК тетрануклеотид pGpTpΨpC, который находится, очевидно, в петлевой области, не модифицируется при действии различных химических агентов. Это является, возможно, следствием экранирования соответствующих нуклеотидов за счет образования некой третичной структуры полимерной молекулы. При действии нуклеаз на различные тРНК в условиях стабилизации вторичной структуры молекулы из всех возможных мест атаки ферментом прежде всего расщепляется петля, содержащая предполагаемый антикодон[283, 290]. В результате молекулу тРНК удается расщепить на две половинки. Это, по-видимому, означает, что пет-

ля с антикодоном находится в несколько отличных от других неспиральных участков условиях и наводит на мысль о существовании особой укладки молекулы, сверх той, которая обусловлена вторичной структурой.

Дальнейшие подтверждения такого вывода были найдены при изучении процесса тепловой денатурации тРНК. Если среда не содержит ионов магния, то в момент, когда оптическая плотность раствора тРНК меняется еще незначительно, гидродинамические характеристики молекулы (такие, как характеристическая вязкость и коэффициент седиментации) претерпевают существенное изменение [289, 291] (рис. 4.24). Поскольку оптические свойства в основном определяются межплоскостными взаимодействиями между основаниями (и парами оснований) цепи, а гидродинамические — объемом и формой молекулы, эти результаты означают, что при малом изменении степени межплоскостных взаимодействий (т. е. вторичной структуры молекулы) происходят значительные изменения в пространственном расположении отдельных частей молекулы тРНК, т. е. в ее третичной структуре.

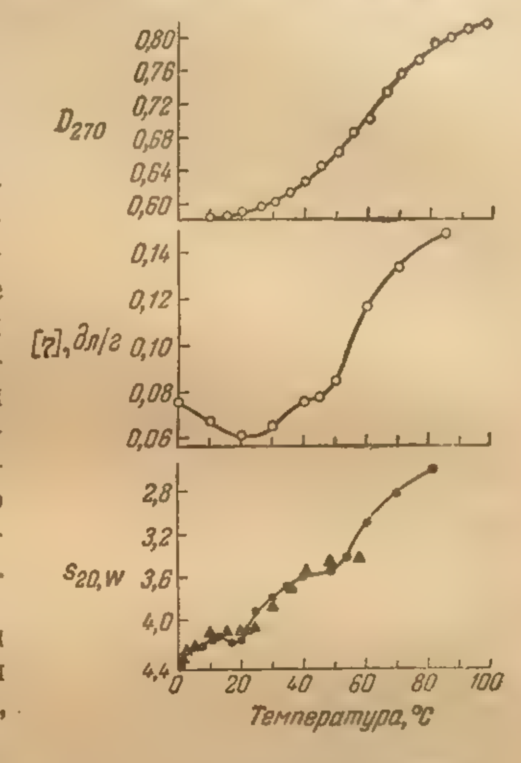


Рис. 4.24. Температурная зависимость некоторых физических параметров тРНК дрожжей в растворе 0,2 *М* NaCl + 0,01 *М* фосфата натрия + 0,0005*М* динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, pH 6,85 (эффекты, наблюдаемые при повышении температуры от 0 до 20° С, связаны с агрегацией тРНК) [291].

Двухфазный характер перехода при денатурации тРНК* следует также из исследований по поляризации флуоресценции красителя акрифлавина, связанного с остатком аденозина на 3′-конце молекулы тРНК, в процессе денатурации тРНК [292, 293].

Свидетельством в пользу существования третичной структуры в ряде индивидуальных тРНК из *E. coli* является [400] двухфазный характер изменения поглощения в области 335 *ммк*, характерного для 4-тиоуридина. Поскольку, как правило, в одной молекуле

* Методом дифференциальной спектрофотометрии при термической денатурации аланиновой тРНК из дрожжей недавно обнаружено существование не менее трех фазовых переходов [397]. Неясно, однако, связаны ли они с третичной структурой или с независимым плавлением отдельных спиральных участков «клеверного листа».

тРНК содержится один остаток 4-тиоуридина, то двухфазный характер плавления вряд ли является следствием независимого плавления отдельных спиральных участков, а скорее всего является результатом поочередного разрушения третичной и вторичной структур молекулы [400].

Интересно отметить, что в присутствии ионов магния и гидродинамические, и оптические свойства тРНК меняются синхронно, причем заметно увеличиваются величина T_m и степень кооперативности перехода [291] (увеличение концентрации одновалентных катионов приводит к возрастанию T_m, но не степени кооперативности). Такой эффект также может быть приписан существованию третичной структуры, если принять, что стабилизованная ионами магния третичная структура предохраняет отдельные спиральные области полинуклеотида от сепаратного плавления, характерного для нестабилизованной молекулы тРНК (в отсутствие ионов магния); при этом третичная структура разрушается одновременно со вторичной.

Рассмотренные физические данные не исключают возможности того, что все наблюдаемые эффекты связаны просто с незначительными изменениями во вторичной структуре. Тем не менее в сочетании с данными по химической модификации и по ферментативному расщеплению стабилизованных молекул тРНК эти эффекты, по-видимому, с большей вероятностью должны быть приписаны изменениям в третичной структуре.

Возможным следствием способности тРНК к образованию третичной структуры является открытое в последние годы существование ряда индивидуальных транспортных РНК [289, 291, 294–301] в двух отличающихся по конформации и способных к взаимному превращению формах, только одна из которых соответствует биологически активной (нативной) форме. Эти две формы заметно отличаются друг от друга по гидродинамическим свойствам, причем биологически неактивная (так называемая «денатурированная») форма менее компактна, чем нативная, и только незначительно отличается по гипохромному эффекту. Оценки различий в числе пар оснований между активной и неактивной формами [291, 297] приводят к величинам 2—5. Условия взаимопревращения этих форм таковы, что позволяют предполагать наличие заметного энергетического барьера между ними. Нативная форма может быть превращена в «денатурированную» при инкубации с комплексообразующими агентами, такими, как трилон В, даже при 0° С [291]. Однако обратный переход при добавлении ионов магния при комнатной температуре протекает медленно и может быть ускорен, если раствор «денатурированной» тРНК нагреть примерно до 60° С, а затем охладить. Это, возможно, означает, что для перехода «денатурированной» формы в нативную необходимо разрушить какую-то структуру (возможно, третичную). Аналогичные переходы происходят при изменении pH. Конечно, не исключено также, что при

денатурации происходит просто значительная перестройка вторичной структуры, приводящая к возникновению структуры, обладающей близким к нативной числом пар оснований, но существенно отличающейся от нее расположением спиральных и петлевых областей.

Можно предположить, что условием биологической активности тРНК является правильно сформированная при данной вторичной третичная структура. Изменения в этой третичной структуре, возможно являющиеся следствием изменений (незначительных) во вторичной структуре, приводят к утрате биологической активности. Условия, в которых возможно восстановление правильной вторичной и третичной структур, приводят и к восстановлению биологической активности.

Предположение о существовании третичной структуры тРНК ставит также вопрос о конкретных способах образования такой структуры. Имеющиеся по этому поводу сведения очень немногочисленны. Как уже отмечалось, петля с антикодоном, вероятно, в меньшей степени экранирована третичной структурой по сравнению с петлей, содержащей «универсальную» последовательность pGpTpΨpC. Этот тетрануклеотидный участок, по-видимому, играет какую-то особую роль при образовании третичной структуры, как следует из сопоставления свойств нативной тРНК и тРНК, в которой остаток псевдоуридина в тетрануклеотиде цианэтилирован действием акрилонитрила [264]. Цианэтилированная тРНК значительно легче расщепляется панкреатической рибонуклеазой в присутствии ионов магния, чем нативная тРНК. При действии фосфодиэстеразы змеиного яда на цианэтилированную тРНК в присутствии Mg^{2+} расщепление не останавливается после отщепления концевой тринуклеотидной последовательности pCpCpA, как это наблюдается для нативной тРНК. Анализ кривых плавления показывает, что после цианэтилирования число образованных пар аденин · урацил и гуанин · цитозин (по сравнению с нативным препаратом) меняется мало; гиперхромные эффекты в обоих случаях низки. Судя по этим данным, цианэтилирование мало сказывается на вторичной структуре, но вызывает значительные изменения третичной структуры. Такой вывод подтверждается также и тем, что плавление макроструктуры цианэтилированной тРНК в присутствии Mg^{2+} представляет менее кооперативный процесс, чем плавление нативной тРНК.

Высказывались предположения о возможности поддержания третичной структуры за счет образования комплементарных пар между основаниями из разных петель, что становится возможным при наложении петель друг на друга [290, 398]. Для тирозиновой тРНК из дрожжей, например, при наложении боковых петель друг на друга возможно образование двух таких пар гуанин · цитозин и двух пар аденин · урацил.

Отмечалось[398], что в ряде тРНК возможна укладка петель за счет образования водородных связей между динуклеотидами pΨpC в pTpΨpC-петле и pApG в дигидроуридиновой петле, а также между pGpG дигидроуридиновой петли и pCpC 3′-концевого тринуклеотида pCpCpA. Для сериновой тРНК из дрожжей возможна, кроме того, связь последовательности pUpU в дополнительной петле с pApA-фрагментом в дигидроуридиновой петле. Такая структура согласуется с данными по окислению тРНК моноперфталевой кислотой при различных температурах[398], однако данные ИК-спектроскопии[386] не согласуются с числом пар оснований, предполагаемым в этой модели.

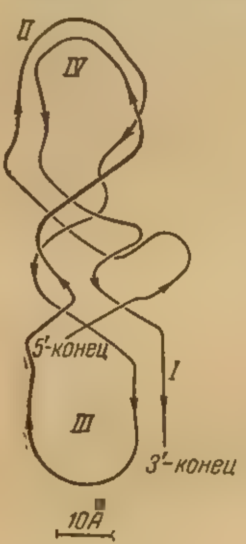


Рис. 4.25. Предлагаемая схема третичной структуры аланиновой тРНК из дрожжей (вторичная структура соответствует модели типа „клеверный лист". обозначение петель см. рис. 4.23, *в*)[288].

Была сделана попытка построить стереохимические модели различных третичных структур аланиновой тРНК (из дрожжей) на базе известной нуклеотидной последовательности и предложенной Холли вторичной структуры молекулы типа «клеверный лист», затем рассчитать для каждой полученной модели интенсивности малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и сопоставить эти значения с экспериментальными величинами[288]. Лучшее совпадение было получено для модели, схематически изображенной на рис. 4.25 (хотя при углах выше 60 *мрад* наблюдаются заметные расхождения). Такая конформация, по-видимому, согласуется с имеющимися данными. Действительно, петля с антикодоном находится в менее экранированном состоянии, чем две другие петли, что должно обеспечивать бо́льшую реакционную способность этого участка. Изложенное, конечно, не исключает возможности существования и других[399] моделей *.

3. Вторичная и третичная структуры 5S РНК

В настоящее время для двух индивидуальных 5S РНК установлена первичная структура молекулы[302–304]. Коэффициент седиментации 5S РНК мало зависит от концентрации ионов магния (в интервале до 10^{-2} *M*) и ионов натрия (в интервале до 0,5 *M*)[305], что дает основание предположить довольно высокую жесткость трехмерной структуры молекулы 5S РНК.

---

* Имеется ряд работ по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей, где на основании вычисленных параметров длины и диаметра молекулы в качестве наиболее вероятной для тРНК принимается конформация шпильки (см., например,[287]).

Значительное увеличение молярной экстинкции препаратов 5S РНК из *E. coli* после обработки формальдегидом [305] позволяет сделать вывод о существовании в молекуле большого числа спаренных оснований. Этот вывод подтверждается и данными по дисперсии оптического вращения (сопоставление экспериментальных данных с рассчитанными для известной нуклеотидной последовательности в предположении, что такая последовательность не дает спирализованных участков, см. стр. 292) [306, 307]. О том же свидетельствует и различная устойчивость олигонуклеотидных участков молекулы к действию нуклеаз, и, наконец, различная реакционная способность одинаковых оснований в полинуклеотидной последовательности 5S РНК [308].

Оценка количества спаренных оснований в молекуле 5S РНК проведена несколькими способами. Исходя из различий гипохромии при 255 *ммк* [305, 306] нативной и обработанной формальдегидом 5S РНК из *E. coli* (см. стр. 288), было сделано заключение о том, что в двухспиральные участки входит от 63% [305] до 67—72% [306] от общего числа нуклеотидов молекулы. Оценка относительного содержания комплементарных пар оснований аденин · урацил и гуанин · цитозин [306], проведенная по спектрам денатурации (см. стр. 288), дает величину 60—70% пар гуанин · цитозин. При окислении адениновых ядер молекулы 5S РНК из *E. coli* мононерфталевой кислотой [308] при 20° С реакционноспособными оказываются только 43,7% оснований, т. е. 23 адениновых звена, что согласуется с количеством пар аденин · урацил, оцениваемым на основании спектров денатурации [197]. Таким образом, для 5S РНК, как и для тРНК, наблюдается высокая степень спирализации молекулы.

В настоящее время предложено несколько моделей вторичной структуры 5S РНК [302, 303, 307, 309]. Модель Сенжера, выдвинутая для 5S РНК из *E. coli*, содержит 23 пары оснований. Это соответствует степени спирализованности полинуклеотида ~38% и плохо согласуется с приведенными выше данными. Другие модели близки между собой по содержанию спаренных оснований и согласуются с найденными физико-химическими характеристиками 5S РНК. Сейчас пока трудно отдать предпочтение какой-либо из них. Все эти модели близко напоминают структуру типа «клеверный лист», предложенную для тРНК. Подобная структура может быть построена для обеих расшифрованных к настоящему времени 5S РНК [309]. Однако сейчас еще рано говорить об ее общности.

Для того чтобы принять компактную форму, соответствующую наблюдаемым гидродинамическим свойствам, молекула 5S РНК должна, вероятно, обладать также и третичной структурой. Недавно были обнаружены различные формы 5S РНК [310], условия взаимопревращаемости которых близки к условиям взаимопревращений «конформомеров» тРНК [310, 401]. Получаемая «денатурированная» форма 5S РНК не обладает биологической активностью. Не

ясно пока, насколько это обстоятельство свидетельствует о близкой аналогии конформаций 5S РНК и тРНК, однако можно полагать, что взаимопревращение различных форм 5S РНК (так же, как и в случае тРНК) наиболее вероятно объясняется перестройкой третичной структуры молекулы при малых изменениях в ее вторичной структуре. Таким образом, на примере двух типов молекул РНК, обладающих одноцепочечной структурой, видно, что для таких молекул в растворе наблюдается образование двухспиральных участков, разделенных неспиральными областями; этим вызвано различие свойств одних и тех же оснований в составе одной молекулы.

Ситуация подобного рода, по-видимому, характерна и для более высокомолекулярных РНК, таких, как 16S и 23S рибосомальные РНК и вирусные РНК. Имеется ряд доводов в пользу такого предположения (см.[243]); в частности, результаты по расщеплению высокомолекулярных РНК нуклеазами показывают, что в этих молекулах имеются достаточно длинные олигонуклеотиды, устойчивые к действию ферментов[311–314]. Теми же методами, что и в случае тРНК и 5S РНК, установлена высокая степень спирализации таких высокополимерных молекул, однако до построения конкретных моделей вторичной структуры здесь еще, естественно, очень далеко. Данная проблема даже при условии установления первичной структуры высокополимерных РНК значительно сложнее, чем в случае низкомолекулярных РНК, поскольку должно иметься, очевидно, существенно большее число вариантов образования различных двухспиральных участков.

Следует заметить, однако, что установление точной вторичной структуры для высокополимерных РНК, возможно, и не имеет особого смысла, ибо в биологических системах такие РНК существуют, как правило, в виде различных комплексов с белками. Вторичная структура РНК в этих комплексах может совершенно отличаться от структуры входящей в них «чистой» нуклеиновой кислоты, и, таким образом, знание последней вряд ли даст значительную информацию о биологических функциях РНК. Более того, не исключено, что высокомолекулярные РНК не обладают единой вторичной структурой, а представлены в растворе набором (может быть, довольно большим) молекул с различными схемами спаривания оснований.

Наиболее важным для химиков следствием существования вторичной и третичной структур полимерных молекул нуклеиновых кислот является различие реакционной способности оснований в двухспиральных и односпиральных молекулах и участках молекул, а также различие реакционной способности оснований в виде мономерных единиц и в составе полинуклеотидных цепей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, **171**, 156, 740 (1953).
2. Hamlin R. M., Lord R. C., Rich A., Science, 148, 1734 (1965).
3. Green D. W., Mathews F. S., Rich A., J. Biol. Chem., 237, 3573, (1962).
4. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A., Science, 154, 518 (1966).
5. Pitha J., Jones R., Pithova P., Canad. J. Chem., 44, 1045 (1966).
6. Попл Дж., Шнейдер В., Бернстейн Г., в кн. «Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения», под ред. Соколова Н. Д., Издатинлит, 1962, стр. 477.
7. Shoup R. R., Miles H. T., Becker E. D., Biochem. Biophys. Res. Comm., **23**, 194 (1966).
8. Katz L., Penman S., J. Mol. Biol., **15**, 220 (1966).
9. Scheit K. H., Angew. Chem., **79**, 90 (1967).
10. Pauling L., Corey R., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 164 (1956).
11. Баклагина Ю. Г., Мол. биол., **2**, 635 (1968).
12. Hoogsteen K., Acta cryst., **12**, 822 (1959); **16**, 907 (1963).
13. Mathews F. S., Rich A., J. Mol. Biol., **8**, 89 (1964).
14. Баклагина Ю. Г., Волькенштейн М. В., Кондрашев Ю. Д., Биофизика, **10**, 165 (1965); Ж. структ. хим., **7**, 399 (1966); ДАН СССР, **169**, 229 (1966).
15. Tomita K., Katz L., Rich A., J. Mol. Biol., **30**, 545 (1967).
16. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **50**, 872 (1963); Acta cryst., **18**, 525 (1965).
17. Katz L., Tomita R., Rich A., J. Mol. Biol., **13**, 340 (1965); Acta cryst., **21**, 754 (1966).
18. O'Brien E. J., J. Mol. Biol., **7**, 107 (1963).
19. O'Brien E. J., Acta cryst., **23**, 92 (1967).
20. Sobell H. M., Tomita K., Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **49**, 885 (1963).
21. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., Nature, **202**, 969 (1964); Acta cryst., **19**, 125 (1965).
22. O'Brien E. J., J. Mol. Biol., **22**, 377 (1966).
23. Hoogsteen K., Acta cryst., **16**, 28 (1963).
24. Mathews F. S., Rich A., Nature, **201**, 179 (1964).
25. Stewart R. F., Jensen L. H., J. Chem. Phys. **40**, 2071 (1964).
26. Iball J., Wilson H. R., Nature, **198**, 1193 (1963).
27. Pullman B., Claverie P., Caillett J., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **55**, 904 (1966).
28. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A., J. Am. Chem. Soc., **89**, 496 (1967).
29. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**, 250 (1967).
30. Binford J. S., Holloway D. M., J. Mol. Biol., **31**, 91 (1968).
31. Kuchler E., Derkosch J., Z. Naturforsch., **21b**, 209 (1966).
32. Miller J. H., Sobell H. M., J. Mol. Biol., **24**, 345 (1967).
33. de Voe H., Tinoco I. jr., J. Mol. Biol., **4**, 500 (1962).
34. Nash H. A., Bradley D. F., Biopolymers, **3**, 261 (1965).
35. Nash H. A., Bradley D. F., J. Chem. Phys., **45** 1380 (1966).
36. Lord R. C., Thomas G. J., Biochim. Biophys. Acta, **142**, 1 (1967).
37. Ts'o P. O. P., Melvin I. S., Olson A. C., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1289 (1963).
38. Broom A. D., Schweizer M. P., Ts'o P. O. P., J. Am. Chem. Soc., **89**, 3612 (1967).
39. Ts'o P. O. P., Chan S. I., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4176 (1964).
40. Solie T. N., Schellman J. A., J. Mol. Biol., **33**, 61 (1968).
41. Rossetti G. P., Van Holde K. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **26**, 717 (1967).

42. Gill S. J., Downing M., Sheats G. F., Biochemistry, 6, 272 (1967).
43. Farquhar E. L., Downing M., Gill S. J., Biochemistry, 7, 1224 (1968).
44. Gellert M., Lipsett M. N., Davies D. K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 2013 (1962).
45. Sarkar P. K., Yang J. T., Biochem. Biophys. Res. Comm., 20, 346 (1965).
46. Ravindranathan R. W., Miles H. T., Biochim. Biophys. Acta, 94, 603 (1965).
47. Chan S. J., Schweizer M. P., Ts'o P. O. P., Helmkamp G. K., J. Am. Chem. Soc., 86, 4182 (1964).
48. Helmkamp G. K., Kondo N. S., Biochim. Biophys. Acta, 145, 27 (1967).
49. Schweizer M. P., Chan S. J., Ts'o P. O. P., J. Am. Chem. Soc., 87, 5241 (1965).
50. Helmkamp G. K., Kondo N. S., Biochim. Biophys. Acta, 157, 242 (1968).
51. Jardetzky O., Biopolymers Symposia, № 1, 501 (1964).
52. De Voe H., J. Chem. Phys., 43, 3199 (1965).
53. Tinoco I. jr., in «Molecular Biophysics», Pullman B., Weissbluth A. (eds), N. Y., Academic Press, 1965, p. 269.
54. Tinoco I. jr., J. Am. Chem. Soc., 82, 4785 (1960).
55. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966, стр. 520.
56. Warshaw H. M., Tinoco I. jr., J. Mol. Biol., 20, 29 (1966), 13, 54 (1965).
57. Felsenfeld G., Leng M., J. Mol. Biol., 15, 455 (1966).
58. Stanley W. M., Bock R. M., Anal. Biochem., 13, 43 (1965).
59. Warshaw M., Bush C. A., Tinoco I., Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 633 (1965).
60. Applequist J., Damle V., J. Am. Chem. Soc., 88, 3895 (1966).
61. Davis R. C., Tinoco I., Biopolymers, 6, 223 (1968).
62. Holcomb D. N., Tinoco I., Biopolymers, 3, 121 (1965).
63. Jnoue Y., Aoyagi S., Nakanishi K., J. Am. Chem. Soc., 89, 5701 (1967).
64. Jnoue Y., Aoyagi S., Nakanishi K., Tetrahedron Letters, 1967, 3575.
65. Vournakis J. M., Scheraga H. A., Rushizky G. W., Sober H. A., Biopolymers, 4, 33 (1966).
66. Aoyagi S., Jnoue Y., J. Biol. Chem., 243, 514 (1968).
67. Bush C. A., Tinoco I., J. Mol. Biol., 23, 601 (1967).
68. Brahms J., Maurizot J. C., Michelson A. M., J. Mol. Biol., 25, 465 (1967).
69. Brahms J., Maurizot J. C., Michelson A. M., J. Mol. Biol., 25, 481 (1967).
70. Brahms J., Michelson A. M., Van Holde K. E., J. Mol. Biol. 15, 467 (1966).
71. Van Holde K. E., Brahms J., Michelson A. M., J. Mol. Biol., 12, 726 (1965).
72. Jnoue Y., Aoyagi S., Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 973 (1967).
73. Scheit K. H., Cramer F., Franke A., Biochim. Biophys. Acta, 145, 21 (1967).
74. Hruska F. E., Danyluk S. S., Biochim. Biophys. Acta, 157, 238 (1968).
75. Chan S. J., Bangerter B. W., Peter H. H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 720 (1966).
76. Ts'o P. O. P., Rappaport S. A., Bollum F. J., Biochemistry, 5, 4153 (1966).
77. Poland D., Vournakis J. N., Scheraga H. A., Biopolymers, 4, 223 (1966).
78. Simpkins H., Richards E. G., Biochemistry, 6, 2513 (1967).
79. Glaubiger D., Lloyd D. A., Tinoco I., Biopolymers, 6, 4091 (1968).
80. Claverie P., Pullman B., Caillet J., J. Theoret. Biol., 12, 419 (1966).
81. Sinanoǵlu O., Abdulnur S., Photochem. Photobiol., 3, 333 (1964).

82. Sinanoglu O., Abdulnur S., Fed. Proc., 24, № 2, part 3, S12 (1965).
83. Wacker A., Lodemann E., Angew. Chem., 77, 133 (1965).
84. Crick F. H. C., Watson J. D., Proc. Roy Soc., A223, 80 (1954).
85. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 52.
86. Dekker C. R., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1953, 947.
87. Brown D. M., Lithgoe B., J. Chem. Soc., 1950, 1990.
88. Lythgoe B, Smith H., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1947, 355; Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1944, 833; Clark V. M., Todd A. R., Zussman J., J. Chem. Soc., 1951, 2952; Furberg S., Acta Chem. Scand, 4, 751 (1950).
89. Cochran W., Acta cryst., 4, 81 (1951).
90. Broomhead J. M., Acta cryst., 1, 324 (1948).
91. Broomhead J. M., Acta cryst., 4, 92 (1951).
92. Furberg S., Acta cryst., 3, 325 (1950).
93. Zussman J., Acta cryst., 6, 504 (1953).
94. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, 171, 964 (1953).
95. Gulland J. M., Jordan D. O., Symp. Soc. Exp. Biol. I. Nucleic acids, 56, Cambridge Univ. Press (1946).
96. Miles H. T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51, 1104 (1964).
97. Miles H. T. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 47, 791 (1961).
98. Printz M. P., von Hippel P. H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 364 (1965).
99. Von Hippel P. H., Printz M. P., Fed. Proc., 24, 1458 (1965).
100. Michelson A. M., Massoulie J., Guschlbauer W., Prog. Nucl. Acid Res., 6, 83 (1967).
101. Arnott S., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., Langridge R., J. Mol. Biol., 11, 391 (1965).
102. Fenghelman M., Langridge R., Seeds W. E., Stockes A. R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. F. H, Barkley R. K., Hamilton L. D., Nature, 175, 834 (1955).
103. Langridge R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., J. Mol. Biol., 2, 19 (1960); Langridge R., Marvin D. A., Seeds W. E., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., J. Mol. Biol. 2, 38 (1960).
104. Fuller W., Wilkins M. H. F., Wilson H. R., Hamilton L. D., J. Mol. Biol., 12, 60 (1965).
105. Cooper P. J., Hamilton L. D., J. Mol. Biol., 16, 562 (1966); Hamilton L. D., Nature, 218, 633 (1968).
106. Marvin D. A., Spencer M., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., J. Mol. Biol., 3, 547 (1961).
107. Luzzati V., Nikolaieff A., Masson F., J. Mol. Biol., 3, 185 (1961).
108. Josse J., Eigner J., Ann. Rev. Biochem., 35, 789 (1966).
109. Мармур Дж., Раунд Р., Шильдкраут К., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 258
110. Crothers D. M., Zimm B. H., J. Mol Biol., 12, 525 (1965)
111. Vinograd J., Lebowitz J., J. Gen Physiol, 49, part 2, 103 (1966); Cohen J. A., Science, 158, 343 (1967).
112. Janz H. S., Baces P. D., Pouwel P. H., Van Bruggen E. E. J., Oldenziel H., J. Mol. Biol., 32, 159 (1968).
113. Shapiro L., Grosman L., Marmur J., Kleinschmidt A. V., J. Mol. Biol., 33, 907 (1968).
114. Bode V. C., MacHattie L. A., J. Mol. Biol., 32, 673 (1968).
115. Hickson F. T., Roth T. F., Helinski D. K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 1731 (1967).
116. Pikó L., Blair D. G., Tyler A., Vinograd J., Proc. Nat. Acad. Sci USA, 59, 838 (1968).
117. Wolstenholme D. R., Dawid I. B., Chromosoma, 20, 445 (1967).

118. Dawid J. B., Wolstenholme D. R., J. Mol. Biol., 28, 233 (1967).
119. Van Bruggen E. F. J., Runner C. M., Ruttenberg G. J. C. M., Kroon A. M., Schurmans-Stekhoven F. M. A. H., Biochim. et Biophys. acta, **161**, 402 (1968).
120. Young E. T., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., **30**, 165 (1967).
121. Gellert M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**, 148 (1967).
122. Vinograd J., Leibowitz J., Watson R., J. Mol. Biol., **33**, 173 (1968).
123. Glaubiger D., Hearst J. E., Biopolymers, **5**, 591 (1967).
124. Bauer W., Vinograd J., J. Mol. Biol., **33**, 141 (1968).
125. Thomas C. A., MacHattie L. A., Ann. Rev. Biochem., **36**, 485 (1967).
126. Ruttenberg G. J. C. M., Smit E. M., Borst P., Van Bruggen E. F. J. Biochim. Biophys. Acta, **157**, 429 (1968).
127. Crawford L. V., Waring M. J., J. Mol. Biol., **25**, 23 (1967); J. Gen. Virol., **1**, 387 (1967).
128. Bujard H., J. Mol. Biol., **33**, 503 (1968).
129. Lang D., Bujard H., Wolff B., Russell D., J. Mol. Biol., **23**, 163 (1967).
130. Arnott S., Hutchinson K., Spencer M., Wilkins M. H. F., Fuller W., Langridge R., Nature, **211**, 227 (1966).
131. Arnott S., Wilkins M. H. F., Fuller W., Langridge R., J. Mol. Biol., **27**, 525 (1967).
132. Arnott S., Wilkins M. H. F., Fuller W., Langridge R., J. Mol. Biol, **27**, 535 (1967).
133. Arnott S., Wilkins M. H. F., Fuller W., Venable J. H., Langridge R., J. Mol. Biol., **27**, 549 (1967).
134. Samejima T., Hashizume H., Imahori K., Fujii Y., Miura K., J. Mol. Biol., **34**, 39 (1968).
135. Miura K. I., Kimura Y., Suzuki N., Virology, **28**, 571 (1966).
136. Sato T., Kyogoku Y., Higuchi S., Mitsui I., Itaka Y., Tsuboi M., Miura K. I., J. Mol. Biol., **16**, 180 (1966).
137. Blach L. M., Markham R., Neth J., Plant. Path., **69**, 215 (1965).
138. Gomatos P. J., Tamm J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **49**, 707 (1963).
139. Langridge R., Gomatos P. J., Science, **141**, 694 (1963).
140. Tomita K., Rich A., Nature, **201**, 1160 (1964).
141. Hashizume H., Imahori K., J. Biochem. (Japan), **61**, 738 (1967).
142. Kraut J., Ann. Rev. Biochem., **34**, 247 (1965).
143. Davies D. R., Ann. Rev. Biochem., **36**, 646 (1967).
144. Langridge R., Marmur J., Science, **143**, 1450 (1964).
145. Микельсон А., в кн. «Химия нуклеозидов и нуклеотидов», Изд. «Мир», 1965, стр. 375.
146. Франк-Каменецкий М. Д., в сб. «Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот», под ред. Лазуркина Ю. С., Изд. «Наука», 1967, стр. 130.
147. Felsenfeld G., Miles H. T., Ann. Rev. Biochem., **36**, 407 (1967).
148. Singer M. F., Heppel L. A., Rushizky G. W., Sober H. A., Biochim. Biophys. Acta, **61**, 474 (1962).
149. Doty P., J. Polymer. Sci., **55**, 1 (1961).
150. Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F., J. Biol. Chem., **236**, 857 (1961).
151. Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F., Biochim. Biophys. Acta, **41**, 175 (1960).
152. Hamaguchi K., Geiduschek E. P., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1329 (1962); Robinson D. K., Grant M. E., J. Biol. Chem., **241**, 4030 (1966); Emanuell C. E., Biochim. Biophys. Acta, **42**, 91 (1960).
153. Микельсон А., в кн. «Химия нуклеозидов и нуклеотидов», Изд. «Мир», 1965, стр. 562.
154. Record M. T., Biopolymers, **5**, 993 (1967).

155. Bunville L. G., Geiduschek E. P., Rawitscher M. A., Sturtevant J. M., Biopolymers, 3, 213 (1965).
156. Weila B., Gill S. J., Biochim. Biophys. Acta, 112, 179 (1966).
157. Lin H J., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 145, 398 (1967).
158. Микельсон А., в кн. «Химия нуклеозидов и нуклеотидов», Изд. «Мир», 1965, стр. 597.
159. Pouwels P. H., Knijnenburg C. M., Van Rotterdam J., Cohen J. A., Jansz H. S., J. Mol. Biol., 32, 169 (1968).
160. Alberts B. M., J. Mol. Biol., 32, 405 (1968); Alberts B. M., Doty P., J. Mol. Biol., 32, 379 (1968); Geiduschek E. P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 950 (1961).
161. Vinograd J., Leibowitz J., Radloff R., Watson R., Laipis P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1104 (1965).
162. Follett E. A. C., Crawford L. V., J. Mol. Biol., 28, 455 (1967); 34, 565 (1968).
163. Crawford L. V., J. Mol. Biol., 13, 362 (1965).
164. Ageno M., Dore E., Frontali K., Atti. Acad. naz. Lincei Rend. Cl. Sci., fis. mat. e natur., 40, 346 (1966).
165. Ageno M., Dore E., Frontali K., Atti. Acad. naz. Lincei Rend. Cl. Sci. fis. mat. e natur., 40, 540 (1966).
166. Davison P. F., J. Mol. Biol., 22, 97 (1966).
167. Davison P. F., Biopolymers, 5, 715 (1967).
168. Spatz H. C., Baldwin R. L., J. Mol. Biol., 11, 213 (1965).
169. Tawashima S., Arnolds E. A., Biochim. Biophys. Acta, 94, 546 (1965).
170. Spatz H., Crothers D. M., J. Mol. Biol., 42, 191 (1969).
171. Евдокимов Ю. М., Варшавский Я. М., ДАН СССР, 170, 1205 (1966).
172. Евдокимов Ю. М., Кнорре К. Г., Варшавский Я. М., Мол. биол., 3, 163 (1969).
173. Rice S. A., Doty P., J. Am. Chem Soc., 79, 3939 (1957).
174. Peacocke A. R., Walker L. O., J. Mol. Biol., 5, 560 (1962).
175. Berg H., Bär H., Gollmick F. A., Biopolymers, 5, 61 (1967).
176. Берг Х., Евдокимов Ю. М., Бёр Х., Варшавский Я. М., Мол. биол., 2, 830 (1968).
177. Евдокимов Ю. М., Берг Х., Бёр Х., Варшавский Я. М., Мол. биол. (в печати).
178. Bunville L. G., Geiduschek E. P., Rawitscher M. A., Sturtevant J. M., Biopolymers, 3, 213 (1965).
179. Follett E A. C., Crawford L. V., J. Mol. Biol., 28, 461 (1967).
180. Jnmań R. B., J. Mol. Biol., 18, 464 (1966).
181. Jnman R. B., J. Mol. Biol., 28, 103 (1967).
182. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С., Мол. биол., 3, 133 (1969).
183. Thomas C. A., MacHattie L. A., Proc. Nat. Acad Sci. USA, 52, 1297 (1964).
184. Wettmur J. C., Davidson N., J. Mol. Biol., 31, 349 (1968).
185. Muriel R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 59, 200 (1968).
186. Karkas J. D., Rudner K., Chargaff E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60, 915 (1968).
187. Rudner R., Karkas J., Chargaff E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60, 921 (1968).
188. Doerfler W., Hogness D. S., J. Mol. Biol., 33, 635 (1968).
189. Aurisicchio S., in «Procedures in Nucleic Acids Research.», Cantoni G. L., Davies D. R. (eds.), N. Y. — L., 1966, p. 562.
190. Wu R., Kaiser A. D., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 57, 170 (1967).
191. Sherdrick P., Szybalski W., J. Mol. Biol., 29, 217 (1967).
192. Corneo G., Ginelli E., Polli E, J. Mol. Biol., 33, 331 (1968).
193. Guha A., Szybalski W., Virology, 34, 608 (1968).

194. Chilton M. D., Science, **157**, 817 (1967).
195. Cordes S., Epstein H. T., Marmur J., Nature, **191**, 1097 (1961).
196. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., **3**, 595 (1961).
197. Waring M., Britten R. J., Science, **154**, 791 (1966).
198. Subirana J. A., Doty P., Biopolymers, **4**, 171 (1966); Subirana J. E., Biopolymers, **4**, 189 (1966).
199. Thrower K J., Peacocke A. R., Biochim. Biophys. Acta, **119**, 652 (1966).
200. Nygaard A. P., Hall B. D., J. Mol. Biol., **9**, 125 (1964).
201. Davis R. W., Davidson N., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **60**, 243 (1968).
202. Brimacombe R. L. C., Kirby K. S., Biochim. Biophys. Acta, **157**, 362 (1968).
203 Arcá M., Di Mauro E. D., Frontali L., Tecce G., Europ. J. Biochem., **5**, 466 (1968).
204. Landy A., Abelson J., Goodman H. M., Smith J. D., J. Mol. Biol., **29**, 457 (1967).
205. Ageno M., Dore E., Frontali C., Area M., Frontali L., Tecce G., J. Mol. Biol., **15**, 555 (1966).
206. Zehavi-Willner T., Comb D. G., J. Mol. Biol., **16**, 250 (1966).
207. Warnaar S. O., Cohen J. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., **24**, 554 (1966).
208. McConcey E. H., Dubin D. T., J. Mol. Biol., **15**, 102 (1966).
209. Murata N., Szybalski W., J. Gen. Appl. Microbiol., **14**, 57 (1968).
210. Winocour E. Virology, **31**, 15 (1967).
211. Brenner D. J., Martin M. A., Hoyer B. H., J. Bacteriol., **94**, 486 (1967).
212. Schildkraut C., Lifson S., Biopolymers, **3**, 195 (1965).
213. Kotin L., J. Mol. Biol., **7**, 309 (1963).
214. Record M. T., Biopolymers, **5**, 975, 993 (1967).
215. Zimm B. H., Bragg J. K., J. Chem. Phys., **31**, 526 (1959).
216. Crothers D. M., Zimm B. H., J. Mol. Biol., **9**, 1 (1964).
217. Веденов А. А., Дыхне А. М., Франк-Каменецкий А. Д., Франк-Каменецкий М. Д., Мол. биол., **1**, 313 (1967).
218. Франк-Каменецкий М. Д., Франк-Каменецкий А. Д., Мол. биол., **3**, 375 (1969).
219. Crothers D. M., Biopolymers, **6**, 1391 (1968).
220. Montroll E. W., Goel N. S., Biopolymers, **4**, 855 (1966).
221. Fink T. R., Crothers D. M., Biopolymers, **6**, 783 (1968).
222. Kallenbach N. R., Crothers D. M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **56**, 1018 (1966).
223. Fraenkel-Conrat H., Biochim. Biophys. Acta, **15**, 307 (1954).
224. Древич В. Ф., Кнорре Д. Г., Малыгин Э. Г., Салганик Р. И., мол. биол., **1**, 299 (1967).
225. Drevich V. F., Salganic R. J., Knorre D. G., Malygin E. G., Biochim. Biophys. Acta, **123**, 207 (1966).
226. Hayatsu H., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, **123**, 458 (1966).
227. Eigen M., J. chim. Phys., **65**, 53 (1968).
228. Englander S. W., Englander J. J., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **53**, 370 (1965).
229. Fresco J. R., Doty P., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3928 (1957).
230. Steiner R., Beers R., Biochim. Biophys. Acta, **26**, 336 (1957).
231. Stevens C. L., Felsenfeld G., Biopolymers, **2**, 293 (1964).
232. Barszcz D., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **11**, 481 (1964).
233. Helmcamp G. K., Ts'o P. O. P., Biochim. Biophys. Acta, **55**, 601 (1962).
234. Brahms J., Nature, **202**, 797 (1964).
235. Brahms J., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3298 (1963).
236. Warshaw H. M., Tinoco I. jr., J. Mol. Biol., **13**, 54 (1965).
237. Fasman G. D., Lindblow C., Grossman L., Biochemistry, **3**, 1015 (1964); Adler A., Grossman L., Fasman G. D., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **57**, 423 (1967).

238. Cantor C. R., Jaskunas S. K., Tinoco J., J. Mol. Biol., **20**, 39 (1966).
239. Brimacombe R. L. C., Biochim. Biophys. Acta, 142, 24 (1967).
240. Griffin B. E., Haslam W. J., Reese C. B., J. Mol. Biol., **10**, 353 (1964).
241. Stevens C. L., Rosenfeld A., Biochemistry 5, 2714 (1966).
242. Epand R. M., Scheraga H. A., J. Am. Chem. Soc., 89, 3888 (1967).
243. Спирин А. С., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1965, стр. 341.
244. Brown G. L., Progr. Nucl. Acid Res., **2**, 259 (1963).
245. Miura K.-I., Prog. Nucl. Acid Res., **6**, 39 (1967).
246. Tissiers A., J. Mol. Biol., **1**, 365 (1960).
247. Cox R. A., Littauer U. Z., J. Mol. Biol., **2**, 166 (1960).
248. Brown G. L., Zubay G., J. Mol. Biol, **2**, 287 (1960).
249. Ofengand E. J., Dieckman M., Berg P., J. Biol. Chem., **236**, 1741 (1961).
250. Fasman G. D., Lindblow C., Seaman F., J. Mol. Biol., **12**, 630 (1965).
251. Киселев Л. Л., Усп. совр. биол., **58**, 177 (1964).
252. Penniston J. T., Doty P., Biopolymers, **1**, 145 (1963).
253. Zubay G., Marciello R., Biochem. Biophys. Res. Comm., **11**, 79 (1963).
254. Киселев Л. Л., Фролова Л. Ю., Борисова О. Ф., Куханова М. К., Биохимия, **29**, 116 (1964).
255. Marciello R., Zubay C., Biochem. Biophys. Res. Comm., **14**, 272 (1964).
256. Hayashi M., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **47**, 1564 (1961).
257. Seidel H., Cramer F., Biochim. Biophys. Acta, **108**, 367 (1965).
258. Yoshida M., Ukita T., J. Biochem. (Japan), **58**, 191 (1965).
259. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Дёмушкин В. П., ДАН СССР, **168**, 102 (1966).
260. Fresco J. R., Alberts N. M., Doty P., Nature, **188**, 98 (1960).
261. Fresco J. R., Klotz L. C., Richards E. G., Cold Spring Harbor Symposia, **28**, 83 (1963).
262. Фреско Ж., в кн. «Информационные макромолекулы», Изд. «Мир». 1965, стр. 100.
263. Boedtker H., Biochemistry, **6**, 2718 (1967).
264. Millar D. B., Biochim. Biophys. Acta, **174**, 32 (1969).
265. McCully K. S., Cantoni G. L., J. Mol. Biol., **5**, 497 (1962).
266. Zubay G., Takanami M., Biochem. Biophys. Res. Comm., **15**, 207 (1964).
267. Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison T. J., Marquisse M., Merrill S. H., Penswic J. K., Zamir A., Science, **147**, 1462 (1965).
268. Zachau H. G., Dütting D., Feldman H., Melchers F., Karau W. Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol., **31**, 417 (1966).
269. Zachau H., Düttig D., Feldman H., Angew. Chem., **78**, 392 (1966).
270. Баев А. А., Венкстерн Т. В., Мирзабеков А. И., Крутилина А. И., Ли Л., Аксельрод В. Д., Мол. биол., **1**, 754 (1967).
271. RajBhandary U. L., Chang S. H., J. Biol. Chem., **243**, 598 (1967).
272. Takemura S., Mirutani T., Mijazahi J., J. Biochem. (Japan), **63**, 277 (1968).
273. Goodman H. M., Abelson J., Landy A., Brenner S., Smith J. D., Nature, **217**, 1019 (1968).
274. Dube S. K., Marcker K. A., Clark B. F. C., Cory S., Nature, **218**, 232 (1968).
275. Cory S., Marcker K. A., Dube S. K., Clark B. F. C., Nature, **220**, 1039 (1968).
276. Staehelin M., Rogg H., Baguley B. C., Ginsburg T., Wehrli W., Nature, **219**, 1363 (1968).
277. Nelson J. A., Ristow S. C., Holley R. W., Biochim. Biophys. Acta, **149**, 590 (1967).

278. Brostoff S. W., Ingram W. M., Science, 158, 666 (1967).
279. Yoshida M., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 123, 214 (1966).
280. Armstrong A., Hagopian H., Ingram V. M, Wagner E. K., Biochemistry, 5, 3027 (1966).
281. Wagner E. K., Ingram V. M., Biochemistry, 5, 3019 (1966).
282. Туманян В Г., в сб. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Ореховича В. Н., Изд. «Медицина», 1966, стр. 72—77.
283. Баев А. А., Фодор И., Мирзабеков А. Д., Аксельрод В Д., Казаринова Л. Я., Мол. биол., 1, 859 (1967).
284. Vournakis J. N., Scheraga H. A., Biochemistry, 5, 2997 (1966).
285. Sarkar P. K., Yang J. T., J. Biol. Chem., 240, 2088 (1965).
286. Sarkar P. K., Yang J. T., Biochemistry, 4, 1238 (1965).
287. Туманян В. Г., Есипова Н. Г., Киселев Л. Л., ДАН СССР, 168, 211 (1966).
288. Lake J A., Beeman W W., J. Mol. Biol., 31, 115 (1968).
289. Henley D. D., Lindahl T., Fresco J. R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 191 (1966).
290. Madison J. T., Everett G. A., Kung H., Science, 153, 531 (1966).
291. Fresco J. R., Adams A., Ascione R., Henley D., Lindahl T., Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol., 31, 527 (1966).
292. Millar D. B., Steiner R. F., Biochemistry 5, 2289 (1966).
293. Millar D. B., McKenzie M. C., Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 724 (1966).
294. Lindahl T., Adams A., Geroch M., Fresco J. R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 178 (1967).
295. Lindahl T., Adams A., Fresco J. R., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 55, 941 (1966).
296. Gartland W., Sueoka N., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 948 (1966).
297. Ishida T., Sueoka N., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 1080 (1967).
298. Lindahl T., Adams A., Science, 152, 512 (1966).
299. Sueoka N., Kano-Sueoka T., Gartland W. J., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 31, 571 (1966).
300. Muench K., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 31, 539 (1966).
301. Adams A., Lindahl T., Fresco J R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1684 (1967).
302. Brownlee G. G., Sanger F., Barrell B. G., Nature, 215, 735 (1967).
303. Brownlee G. G., Sanger F., Barrell B. G., J. Mol. Biol., 34, 379 (1968).
304. Forqet B. G., Weissman N., Science, 158, 1695 (1967).
305. Boedtker H., Kelling D. G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, 758 (1968).
306. Cantor C. R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 59, 478 (1968).
307. Cantor C. R., Nature, 216, 513 (1967).
308. Cramer F., Erdmann V. A., Nature, 218, 92 (1968).
309. Raacke J. D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 31, 528 (1968).
310. Aubert M., Scott J. F., Reynier M., Monier R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 292 (1968).
311. McPhie P., Hounsell J., Gratzer W. B., Biochemistry, 5, 988 (1966).
312. Gould H., Biochemistry, 5, 1103 (1966); Biochim. Biophys. Acta, 123, 441 (1966).
313. Gould H., J. Mol. Biol., 29, 307 (1967).
314. Strauss J. H., Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 34, 453 (1968).
315. Wang J. C., Baumgarten D., Olivera B. M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 1852 (1967).
316. Hudson B., Upholt W. B., Devinny J., Vinograd, J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 813 (1969).
317. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A., Biochim. Biophys. Acta, 179, 10 (1969).

318. Ts'o P. O. P., Kondo N. S., Schweizer M. P., Hollis D. P., Biochemistry, 8, 997 (1969).
319. Chan S. I., Nelson J. H., J. Am. Chem. Soc., 91, 168 (1969).
320. McDonald C. C., Phillips W. D., Lazar J., J. Am. Chem. Soc., **89**, 4166 (1967).
321. Smith I. C. P., Blackburn B. J., Yamane T., Canad. J. Chem., **47**, 513 (1969).
322. Sheit K. H., Saenger W., FEBS Letters, **2**, 305 (1969).
323. Adler A. J., Grossman L., Fasman C. D., Biochemistry, 7, 3836 (1968).
324. Maurizot J. C., Wechter W. J., Brahms J., Sadron Ch., Nature, **219**, 377 (1968).
325. Maurizot J. C., Brahms J., Eckstein F., Nature, **222**, 559, (1969).
326. Adler A. J., Grossman L., Fasman C. D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**, 423 (1967).
327. Brahms J., Maurizot J. C., Pilet J., Biochim. Biophys. Acta, 186, 110 (1969).
328. Brahms J., Aubertin A., Ditheimer G., Grunberg-Manago M., Biochemistry, **8**, 3269 (1969).
329. Inoue Y., Satoh K., Biochem J., **113**, 843 (1969).
330. Opschoor A., Pouwels P. H., Knijnenberg C. M., Aten J. B. T., J. Mol. Biol., **37**, 13 (1968).
331. Wang J. C., J. Mol. Biol., **43**, 45 (1969).
332. Wang J. C., J. Mol. Biol., **43**, 263 (1969).
333. Eisenberg H., Cohen G., J. Mol. Biol., **37**, 355 (1968).
334. Luzzati V., Masson F., Mathis A., Saludjan P., Biopolymers, **5**, 491 (1967).
335. Nass M. M. K., Science, **165**, 25 (1969).
336. Bourguignon M. F., Bourgaux P., Biochim. Biophys. Acta, **169**, 476 (1968).
337. Fuller W., Waring M. J., Ber. Bunsenges. physik. Chem., **68**, 805 (1964).
338. Waring M. J., Biochem J., **109**, 28 p (1968).
339. Arnott S., Fuller W., Hodson A., Prutton J., Nature, **220**, 561 (1968).
340. Bush C. A., Scheraga H. A., Biopolymers, **7**, 395 (1969).
341. Printz M. P., von Hippel P. H., Biochemistry, **7**, 3194 (1968).
342. McConnel B., von Hippel P. H, Fed. Proc., **27**, 802 (1968).
343. Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., **5**, 109 (1962).
344. Silvestri L. G., Hill L. R., J. Bacteriol., **90**, 136 (1965).
345. Bonachek J., Kokur M., Martinec T., J. Gen. Microbiol., **46**, 369 (1969).
346. Owen R. J., Hill L. R., Lapage S. R., Biopolymers, **7**, 503 (1969).
347. Gruenwedel D. W., Hsu C.-H., Biopolymers, **7**, 557 (1969).
348. Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **45**, 482 (1959).
349. Löber G., Zimmer C. H., Biochem Biophys. Res. Comm., **31**, 641 (1968).
350. Michelson A. M., Pochon F., Biochim. Biophys Acta, **174**, 604 (1969).
351. Luck G., Zimmer Ch., Biochim. Biophys. Acta, **169**, 466 (1968).
352. Zimmer Ch., Luck G., Venner H., Fric J., Biopolymers, **6**, 563 (1968).
353. Courtois Y., Fromageot P., Gushlbauer W., Europ. J. Biochem., **6**, 493 (1968).
354. Luck G., Zimmer Ch., Shatzke G., Biochim Biophys. Acta, **169**, 548 (1968).
355. Zimmer Ch., Biochim. Biophys. Acta, **161**, 584 (1968).
356. Chapman R. E., Sturtewant J. M., Biopolymers, **7**, 527 (1969).
357. Basu S., Z. Naturforsch., **24b**, 511 (1969).
358. Bartl P., Boublik M., Biochim. Biophys. Acta, **103**, 678 (1965).
359. Bagchi B., Misra D. N., Basu S., Das Gupta N. N. Biochim. Biophys Acta, **182**, 551 (1969).
360. Кушнер В. П., Захарова Н. В., Мол биол. **3**, 384 (1969).

361. Jansz H. S., Baas P. D., Pouwels P. H., van Bruggen E. F. J. Oldenziel H. J., J. Mol. Biol., 32, 159 (1968).
362. Pouwels P. H., van Rotterdam J., Cohen J. A., J. Mol. Biol., 40, 379 (1969).
363. Massie H. R., Zimm B. H., Biopolymers, 7, 475 (1969).
364. McCarthy B. J., Bacter. Rev., 31, 215 (1967).
365. Britten R. J., Kohne D. E., Science, 161, 529 (1968).
366. Thrower K. J., Peacocke A. R., Biochem. J., 109, 543 (1969)
367. Studier F. W., J. Mol. Biol., 41, 189 (1969).
368. Studier F. W., J. Mol. Biol., 41, 199 (1969).
369. Wood D. D., Luck D. J. L., J. Mol. Biol., 41, 211 (1969).
370. Bishop J. O., Biochem. J., 108, 35p (1968).
371. Bishop J. O., Biochem. J., 113, 805 (1969).
372. Melli M., Bishop J. O., J. Mol. Biol., 40, 117 (1969).
373. Bonner J., Kung G., Bekhor I., Biochemistry, 6, 3650 (1967).
374. McConaughy B. L., Laird C. D., McCarthy B. J., Biochemistry, 8, 3289 (1969).
375. Legault-Demare J., Dessaux B., Heyman T., Seror S., Ress G. P., Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 550 (1967).
376. Bekhor I., Bonner J., Dahmus G. K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 271 (1969).
377. Klotz L. C., Biopolymers, 7, 265 (1969).
378. Lehman G. W., McTague J. P., J. Chem. Phys., 49, 3170 (1969).
379. Франк-Каменецкий А. Д., Франк-Каменецкий М. Д., Мол. биол., 2, 778 (1968).
380. Goel N. S., Maitra S. C., J. Theoret. Biol., 23, 87 (1969).
381. Hiroyashi I., Doty P., Repts. Progr. Polym. Phys. Japan., 11, 533 (1968).
382. Bobst A. M., Cerrutti P. A., Rottman F., J. Am. Chem. Soc., 91, 1246 (1969).
383. Mirzabekov A. D., Kazarinova L. Ya., Latity D., Baev A. A., FEBS Letters, 3, 268 (1969).
384. Imura N., Weiss G. B., Chambers R. W. Nature, 222, 1147 (1969).
385. Imura N., Schwamm H., Chambers R. W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 1203 (1969).
386. Tsuboi M., Higuchi S., Kyogoku Y., Nishimura S., Biochim. Biophys. Acta, 195, 23 (1969).
387. Morikawa K., Tsuboi M., Kyogoku Y., Seno T., Nishimura S., Nature, 223, 537 (1969).
388. Cox R. A., Quart. Rev., 82, 499 (1968).
389. Clark B. F., Doctor B. P., Holmes K. C., Klug A., Marcker K. A., Morris S. J., Paradies H. H., Nature, 219, 1222 (1968).
390. Vold B. S., Biochem. Biophys. Res. Comm., 35, 222 (1969).
391. Fresco J. R., Blake R. D., Langridge R., Nature, 220, 1285 (1968).
392. Doctor B. P., Fuller W., Webb N. L., Nature, 221, 58 (1969).
393. Thomas G. J. jr, Biopolymers, 7, 325 (1969).
394. Cotter R. I., Gratzer W. B., Nature, 221, 154 (1969).
395. Thomas G. J. jr, Spencer M., Biochim. Biophys. Acta, 179, 360 (1969).
396. Kallenbach N. R., J. Mol. Biol., 37, 445 (1968).
397. Riesner D., Römer R., Maass G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 35, 369 (1969).
398. Cramer F., Doepner H., Haar F., Schlimme E., Seidel H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 61, 1384 (1969).
399. Melcher G., FEBS Letters, 3, 185 (1969).
400. Seno T., Kobayashi M., Nishimura S., Biochim. Biophys. Acta, 174, 71 (1969).
401. Scott J. F., Monier R., Aubert M., Reynier M., Biochem. Biophys. Res. Comm, 33, 794 (1968).

РЕАКЦИИ ЗАМЕЩЕНИЯ И ПРИСОЕДИНЕНИЯ ПО ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМ ЯДРАМ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

I. ВВЕДЕНИЕ

Реакции замещения в гетероциклическом ядре оснований нуклеиновых кислот характерны как для пуриновых, так и для пиримидиновых производных. Они включают реакции электрофильного замещения протонов, связанных с атомами углерода или азота, входящими в состав цикла, а также реакции нуклеофильного замещения экзоциклических аминогрупп. Реакции присоединения по углерод-углеродной двойной связи гетероцикла, которые могут быть как электрофильными, так и нуклеофильными, пока известны только для пиримидиновых оснований, тогда как у пуринов связь С-4—С-5, по-видимому, весьма стабильна. К реакциям присоединения можно условно, как сделано в этой книге, отнести также электрофильные реакции по атомам азота пиридинового типа, обладающим свободной электронной парой. В результате таких реакций в гетероциклическом ядре появляется новая группа без удаления групп или атомов, уже бывших в составе ядра до реакции.

В данной главе рассматриваются все указанные типы реакций. Они характерны тем, что приводят к модификации гетероциклического ядра без его разрушения. Попутно здесь рассматриваются также некоторые реакции, в которых продукты присоединения или замещения являются нестабильными и претерпевают дальнейшие превращения. Более подробно такие реакции рассмотрены в других главах.

II. РЕАКЦИИ ЗАМЕЩЕНИЯ И ПРИСОЕДИНЕНИЯ ПО АТОМАМ УГЛЕРОДА

1. Галоидирование

Пиримидиновые производные. При галоидировании в безводной среде происходит непосредственное замещение атома водорода у углеродного атома С-5 пиримидинового цикла. Такое замещение может быть осуществлено действием либо свободных галоидов, либо N-галоидамидов.

Действие галоидов. Наиболее распространенным способом получения 5-хлор- и 5-бром (но не 5-иод-) производных пиримидиновых оснований нуклеозидов и нуклеотидов является галоидирование действием свободных галогенов в безводной среде. Реакция может быть, по-видимому, представлена следующей схемой, которая предполагает электрофильную атаку положительным ионом галоида по атому С-5, обладающему избытком π-электронной плотности (см. стр. 153).

$$\mathrm{Hal^+} + \text{(урацил, R)} \longrightarrow \left[\text{σ-комплекс: H, Hal при C-5; }^{+}\text{ при C-6}\right] \xrightarrow{-\mathrm{H^+}} \text{5-Hal-урацил (R)}$$

R—атом водорода или углеводный остаток

Обычно хлорирование производных урацила осуществляют добавлением раствора хлора в четыреххлористом углероде к раствору исходного соединения в ледяной уксусной кислоте. Реакция протекает очень легко и заканчивается в течение нескольких часов при комнатной температуре или за несколько минут в более жестких условиях, Таким способом удалось получить 5-хлоруридин [1, 2], 5-хлордезоксиуридин [3], 5-хлоруридин-5′-фосфат [4, 5] и 5-хлоруридин-2′(3′)-фосфат [6]. Цитидин в этих условиях хлорируется плохо, и получить с удовлетворительным выходом 5-хлорцитидин не удается [7]. Скорее всего это связано с тем, что в ледяной уксусной кислоте цитидин существует в протонированной форме и электрофильная атака катиона цитидина затруднена. Однако при облучении ультрафиолетовым светом реакционной смеси, содержащей хлор и цитидин [7] (или дезоксицитидин [8]), 5-хлорпроизводное образуется очень гладко. Бо́льшая легкость реакции обусловлена, возможно, тем обстоятельством, что в реакцию вступает возбужденное цитозиновое ядро (см. гл. 12); не исключено, однако, что при облучении меняется механизм реакции и вместо электрофильного происходит гомолитическое замещение за счет образования радикалов хлора.

Бромирование производных урацила бромом в органических растворителях также протекает в очень мягких условиях. Так, например, в диметилформамиде при добавлении брома 5-бромпроизводные уридина образуются с практически количественными выходами за несколько минут уже при 0° С [9]. Аналогично, хотя и в несколько более жестких условиях, при бромировании в этиловом спирте был получен 5-бромуридин [10]. При использовании в качестве растворителей диметилформамида [9], пиридина [11] и формамида [11]

были получены 5-бромпроизводные цитидина[9] и дезоксицитидина[11]. Мягкие условия бромирования позволяют непосредственно вводить галоид в пиримидиновое ядро таких лабильных соединений, как нуклеозидтрифосфаты, что и было использовано, в частности, для получения 5-бромдезоксицитидинтрифосфата действием при комнатной температуре раствора брома в четыреххлористом углероде на растворенный в формамиде трифосфат[12].

Присутствие воды в органических растворителях приводит к присоединению по двойной связи[9] (см. стр. 330), однако если в реакционной смеси присутствует кислота, то в конечном итоге образуются 5-бромпроизводные. Так, при бромировании нуклеозидмонофосфатов в смеси диоксана с разбавленной азотной кислотой раствором брома в CCl_4 образуются почти количественно 5-бромуридинмонофосфаты[4, 6] и 5-бромцитидинмонофосфаты[5]. В данном случае остается неясным, идет ли бромирование по механизму непосредственного электрофильного замещения, или в качестве промежуточного продукта образуется 5-бром-6-окси-5,6-дигидронуклеозидмонофосфаты (см. стр. 330). С хорошими выходами 5-бромпроизводные получаются также при действии брома с одновременным облучением ультрафиолетовым светом[7, 8]. Как и в случае хлорирования (см. стр. 312), пока неясно, по какому механизму протекает эта реакция.

Иодирование пиримидиновых оснований протекает в значительно более жестких условиях. Так, например, в методе Прусофа[13, 14], широко применяющемся для синтеза 5-иодпроизводных уридина и дезоксиуридина, используется нагревание нуклеозида с иодом в хлороформенном растворе в присутствии разбавленной азотной кислоты в течение нескольких часов. Модификации этого метода заключаются в применении азотной кислоты разной концентрации, в использовании различных органических растворителей или разной продолжительности реакции. Эти модификации использовались для получения 5-иодуридина[13, 15–17], 5-иоддезоксиуридина[14, 16] и меченных радиоактивными изотопами иода 5-иодпроизводных уридина[13, 18] и дезоксиуридина[18, 19]. Хорошие результаты получаются также при использовании метода Прусофа для иодирования уридин-5′-фосфата[4, 20] и уридин-2′(3′)-фосфата[6]. Другим возможным способом получения 5-иодпроизводного урацила является иодирование элементарным иодом в присутствии щелочи[14, 18].

Применение метода Прусофа для получения 5-иодпроизводных цитидина и дезоксицитидина малоэффективно, поскольку в условиях реакции в сильной степени происходит гидролиз N-гликозидной связи[21]. Однако если заменить азотную кислоту HIO_3, то с хорошими выходами и в довольно мягких условиях удается получить нуклеозидные и нуклеотидные производные 5-иодцитидина[6, 21, 22]. Следует отметить, что при использовании последнего метода

наблюдается побочная реакция, приводящая к образованию 9—10% соединения, насыщенного по С-5—С-6-двойной связи[22, 23], которое, по-видимому, является 5,5-дииод-5,6-дигидро-6-оксициклодезоксиуридином I[23].

I

Образование этого продукта, очевидно, аналогично образованию 5,5-дибром-6-окси-5,6-дигидропроизводных урацила и цитозина при бромировании в водной среде (см. стр. 331).

В значительно более мягких условиях иодирование протекает, если в качестве иодирующего агента используется хлористый иод ICl[24, 25]. Проведение реакции в N-этилацетамиде[24, 25] и диметилсульфоксиде[24] приводит к высоким выходам иодпроизводных уже при комнатной температуре. При использовании в качестве растворителя диметилформамида[26] образуются значительные количества 5-иод-6-окси-5,6-дигидропиримидиновых производных, что связано, по-видимому, с трудностями полного удаления воды из данного растворителя. Параллельно, однако, проходит и прямое замещение водорода с образованием 5-иодпроизводного. Следует отметить, что образование иодпроизводных при использовании в качестве галоидирующего агента хлористого иода свидетельствует об электрофильном характере рассматриваемой реакции.

Действие N-галоидамидов и N-галоидимидов. N-Галоидамиды и N-галоидимиды являются эффективными галоидирующими агентами, позволяющими в чрезвычайно мягких условиях производить замену водорода при С-5 пиримидинового цикла. 5-Хлорпроизводные уридина и цитидина образуются при действии на уридин и цитидин N-хлорсукцинимида в диметилформамиде[27, 28]. Аналогично при действии N-бромсукцинимида на триалкиламмониевые соли уридинфосфатов в диоксане за несколько дней при комнатной температуре удается получить практически количественные выходы соответствующих 5-бромпроизводных[29—32].

Интересно отметить, что для иодирования N-иодсукцинимидом в диметилсульфоксиде[24] необходимы каталитические количества ди-*н*-бутилдисульфида; в N-этилацетамиде как растворителе реакция не идет даже в присутствии катализатора. Возможно, что

ди-*н*-бутилдисульфид необходим для образования промежуточного галоидирующего агента, например *н*-бутилсульфенилиодида[33]. Другим интересным обстоятельством является тот факт, что если иодирование производных урацила идет легко и в мягких условиях, так что удается из уридинтрифосфата с хорошим выходом получить 5-иодуридинтрифосфат[24], то производные цитозина в этих же условиях не иодируются. Причина этого явления пока не ясна.

Пуриновые производные. Если в пиримидинах замещение водорода на галоид происходит только в безводной среде, то в пуринах, где невозможна конкурирующая реакция присоединения по двойной связи $C\text{-}4—C\text{-}5$, замещение наблюдается как в водных, так и в безводных растворителях, причем, как уже отмечалось ранее (см. стр. 199), производные гуанина галоидируются значительно легче, чем производные аденина.

При бромировании бромной водой при комнатной температуре происходит быстрое разрушение гуанинового цикла, что приводит к исчезновению поглощения растворов гуанозина в области 250—300 *ммк*[34–36]. Среди продуктов, образующихся при бромировании гуанозина в воде, удается выделить 8-бромгуанозин II[37, 38], который, однако, быстро окисляется бромом с разрушением как пиримидинового, так и имидазольного циклов[38]. В конечном итоге образуются рибозилмочевина III, рибозилоксалуровая кислота IV, щавелевая кислота и гуанидин.

Тем не менее действие бромной воды в мягких условиях может быть использовано для препаративного получения производных гуанина[339, 340]. Так, при использовании 1,2 *экв* бромной воды

в буферном растворе (pH 3) при комнатной температуре был получен 8-бромгуанозин-5′-фосфат; выход более 60%[340]. Повышение или понижение pH среды уменьшало выход продукта.

При использовании органических растворителей основным продуктом реакции гуанозина с бромом является 8-бромгуанозин независимо от того, проводится ли реакция в диметилформамиде[9], ледяной уксусной кислоте[39], диоксане[40] или в смеси диоксана с метилцеллозольвом[41]. При проведении реакции между эквивалентными количествами гуанозина и брома при 0° С в диметилформамиде выход бромпроизводного уже через 30 *сек* достигает 50% и далее не меняется в течение часа[9]. Скорость образования 8-бромгуанозина приблизительно равна скорости образования в тех же условиях 5-бромцитидина и 5-бромуридина.

При бромировании в диметилформамиде при 0° С аденозин не затрагивается, однако при проведении реакции при 50—60° С в ледяной уксусной кислоте довольно легко образуется[39, 42] 8-бромаденозин *.

Причины различного поведения аденозина в этих двух растворителях пока не ясны.

В водных растворах производные аденина под действием бромной воды не бромируются. Однако в присутствии щелочи[43, 340, 341] или в буферных растворах с pH $\geqslant$ 3 образуются соответствующие 8-бромпроизводные[340, 341]. При значениях pH$\geqslant$7 в процессе бромирования, по-видимому, протекает деградация гетероциклического основания. При значениях pH < 3 реакция замедляется, вероятно, вследствие протонирования аденинового ядра, которое затрудняет электрофильную атаку. Бромированием в буфере с pH, примерно равным 4, при комнатной температуре были получены с высокими выходами 2′-, 3′- и 5′-фосфаты 8-бромаденозина, а также 8-бромаденозинди- и трифосфаты[43, 341].

Реакция иодирования с помощью хлористого иода в органических растворителях, таких, как N-этилацетамид[25] или диметилформамид[26], затрагивает только гуанозин, тогда как адениновое ядро при этом остается неизменным.

Превращения, происходящие с пуриновыми основаниями (в составе нуклеозидов) при их галоидировании с использованием в качестве галоидирующих агентов N-галоидамидов и N-галоидимидов, исследованы пока недостаточно. В настоящее время можно заключить лишь следующее: при действии на пуриновые нуклеозиды N-хлорсукцинимида в диметилформамиде аденин не затрагивается, тогда как гуаниновый цикл разрушается, возможно, с промежуточным образованием 8-хлоргуанозина[27, 28].

В отличие от этого бромирование аденозина и дезоксиаденозина в виде их 2′,3′,5′-три- и 3′,5′-ди-О-ацетильных производных в хлоро-

* Для реакции в ледяной уксусной кислоте используются 2′,3′,5′-три-О-ацетильные производные аденозина[39] или 2′,3′-изопропилиденаденозин[42].

форме действием N-бромацетамида в очень мягких условиях дает 8-бромпроизводные [39]. Действие N-бромсукцинимида в воде не затрагивает аденозин, но приводит к изменению гуанозина с образованием, по-видимому, 8-бромгуанозина [37]. N-Иодсукцинимид в воде [37] не реагирует ни с аденозином, ни с гуанозином, но в диметилсульфоксиде в присутствии ди-*н*-бутилдисульфида гуанозин в очень мягких условиях иодируется с образованием 8-иодгуанозина [24], тогда как аденозин в этих условиях остается неизменным.

Заканчивая рассмотрение реакций галоидирования мономерных компонентов нуклеиновых кислот, следует отметить следующие основные закономерности:

а) галоидирование протекает путем первичной атаки галоида по атому С-5 пиримидиновых и атому С-8 пуриновых оснований;

б) по своей реакционной способности в этой реакции галоиды можно расположить в ряд Cl_2, $Br_2 > ICl > I_2$;

в) скорость и направление реакции галоидирования сильно зависят от природы растворителя, присутствия в реакционной смеси воды, а в случае N-галоидамидов и N-галоидимидов карбоновых кислот — от присутствия катализаторов (таких, как алкилдисульфиды).

Характеристики галоидпроизводных. Введение галоида в гетероциклическое ядро приводит к батохромному сдвигу в ультрафиолетовой области спектра по сравнению с исходным негалоидированным соединением (см., например, [6, 15, 39]). Особенно это заметно для пиримидиновых производных. Величина батохромного сдвига увеличивается в ряду F- < Cl- < Br- < I- (табл. 5.1). В этом же ряду уменьшается разность между значениями рK_a негалоидированных и галоидсодержащих нуклеозидов.

Таблица 5.1. **Спектральные и кислотно-основные характеристики нуклеозидных производных урацила и их галоидзамещенных** [15, 44]

Соединение	λ_{max}, *ммк* (pH 1,0—5,0)	рK_a	Соединение	λ_{max}, *ммк* (pH 1,0—5,0)	рK_a
Уридин	262	9,25	5-Бромуридин	279	8,20
Дезоксиуридин	262	9,30	5-Бромдезоксиуридин	280	7,90
5-Фторуридин	271	7,75	5-Иодуридин	291	8,50
5-Фтордезоксиуридин	271	7,80	5-Иоддезоксиуридин	287	8,20
5-Хлоруридин	278	8,20			
5-Хлордезоксиуридин	279	7,90			

Уменьшение рK_a при введении галоида в гетероциклическое ядро дает возможность отделять галоидированные нуклеозиды от негалоидированных методами, основанными на различии в величине заряда, например ионообменной хроматографией [18, 19].

Введение галоида в гетероциклическое ядро пиримидиновых производных понижает стабильность N-гликозидной связи соответствующих нуклеозидов в кислой среде (см. стр. 486), а также снижает устойчивость гетероциклического ядра к щелочному расщеплению. Введение галоида существенно сказывается и на фотохимическом поведении пиримидиновых оснований и их производных (см. гл. 12).

Реакционная способность галоидного заместителя в пиримидиновом цикле довольно низка. Тем не менее, известен ряд реакций обмена галоида, дающих возможность синтезировать 5-замещенные аналоги, широко используемые в биологических исследованиях. Так, например, при кипячении 5-бромуридина с морфолином был получен 5-морфолиноуридин [45]; из 5-бромпроизводных урацила под действием бикарбоната натрия в щелочной среде образуются 5-оксипроизводные [46, 47]. Описано также превращение 5-бромуридина [48, 49] и 5-бромдезоксиуридина [50] в 5-аминопроизводные при действии аммиака при 50—55° С под давлением. Значительно более подвижен галоид, связанный с атомом С-8 в пуриновых производных. Это позволяет получать 8-замещенные аналоги природных нуклеозидов и нуклеотидов путем обмена галоида под действием различных нуклеофильных реагентов [39, 51, 52, 339–341], а также синтезировать циклонуклеозиды, у которых кислород гидроксильной группы углеводного остатка связан с атомом С-8 пурина [41, 42].

5-Галоидпроизводные пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов широко применяются в различного рода биологических исследованиях, связанных, например, с изучением механизмов ферментативных реакций [53] или мутационных процессов [53–56].

Полинуклеотиды. Вследствие плохой растворимости полинуклеотидов в малополярных растворителях их галоидирование в среде, не содержащей воды, не получило широкого распространения. Трудностей, связанных с малой растворимостью, до некоторой степени удается избежать путем использования тетраалкиламмониевых солей полинуклеотидов, содержащих длинные алкильные радикалы. Так, при использовании растворов триметилгексадециламмониевых (цетавлоновых) солей ДНК [57], рибосомальной и транспортной РНК [58] в безводном диметилформамиде удалось провести бромирование этих полинуклеотидов бромом.

При галоидировании рибонуклеиновых кислот (в течение 30 *сек* при 0° С, добавлением в реакционную смесь различного количества брома) было обнаружено, что так же, как и в случае мономеров, адениновые ядра не галоидируются, тогда как урацильные, цитозиновые и гуаниновые ядра бромируются, давая соответственно 5-бромурацил-, 5-бромцитозин- и 8-бромгуанинпроизводные. Степень галоидирования возрастает с увеличением концентрации брома в реакционной среде, причем после реакции при

любых концентрациях брома содержание 8-бромгуанина превышает содержание 5-бромурацила; 5-бромцитозиновые продукты образуются в наименьшем количестве. Так, при бромировании суммарной тРНК из дрожжей с использованием соотношения 2 *моль* брома на 1 *моль* нуклеотидов было получено (в виде производных) 40—60% 8-бромгуанина, 30—50% 5-бромурацила и 10% 5-бромцитозина, считая от исходного содержания каждого из этих оснований в реакционной смеси. Следует отметить, что в процессе галоидирования в данных условиях происходило частичное разрушение гуаниновых ядер. Полинуклеотидная цепь тРНК при бромировании не расщеплялась, как это следует из данных по ультрацентрифугированию, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии препаратов. При обработке в этих условиях рибосомальной РНК наблюдалась заметная деградация цепи — коэффициенты седиментации как 16S, так и 23S компонентов снижались до значения 5S [58]. Бромирование приводит, кроме того, к нарушению вторичной структуры тРНК, возрастающему с увеличением степени модификации, что выражается в уменьшении температуры плавления и величины гипохромного эффекта. При бромировании ДНК гуанин также оказывается наиболее реакционноспособным основанием (табл. 5.2).

Таблица 5.2. **Относительный состав оснований ДНК после обработки бромной водой (0 °С, 10 *мин*) с последующим гидролизом хлорной кислотой** [57]

Число молей брома на 1 *моль* основания	Относительный состав оснований				
	аденин	гуанин	цитозин	тимин	8-бромгуанин
Исходная ДНК	1	0,82	0,82	1,09	—
0,25	1	0,73	0,71	1,04	0,08
0,5	1	0,63	0,76	0,97	0,16
0,75	1	0,52	0,77	1,08	0,16
1,0	1	0,49	0.74	1,06	0,21
3,0	1	0,15	0,50	1,22	0,20

В значительно меньшей степени модифицируется ядро цитозина, и совершенно не затрагивается ядро тимина. Отсутствие модификации тимина в составе ДНК остается пока не объясненным, поскольку бромирование самого тимина в этих же условиях приводит к 5-бром-6-окси-5,6-дигидротимину, который образуется, по-видимому, за счет присутствия следов воды в растворителе.

Из данных табл. 5.2 видно, что при бромировании ДНК, так же как и в случае РНК, наблюдается частичное разрушение гуаниновых ядер. В используемых условиях при бромировании ДНК (как и для РНК) бромирование цитозиновых ядер происходит практически мгновенно, причем модифицируется определенная

доля оснований, после чего количество модифицированных звеньев не увеличивается. Например, при соотношении 1 *моль* брома на 1 *моль* оснований ДНК при 0° С в первые 10 *мин* модифицируется 16% цитозиновых ядер, и это количество не меняется в последующие 30 *ч*. Для гуанина после первой быстрой реакции наблюдается более медленное нарастание степени модификации, так что если в первые 10 *мин* модифицируется 22% от содержания гуанина, то через 30 *ч* количество 8-бромгуанинпроизводных достигает 60%. Бромирование ДНК, как и в случае тРНК, приводит к изменению ее вторичной структуры, о чем можно судить по уменьшению вращения, характеристической вязкости раствора, а также по уменьшению T_m, ослаблению гипохромного эффекта и расширению интервала плавления [59]. Различие в поведении ДНК и РНК при бромировании, а также обнаруженные кинетические закономерности пока не объяснены.

Если при бромировании нуклеиновых кислот наиболее реакционноспособным основанием является гуанин, то при иодировании под действием хлористого иода более реакционноспособными оказываются пиримидиновые основания [25]. Так, после иодирования триметилгексадециламмониевой соли тРНК 0,02 *М* раствором хлористого иода в растворе диметилформамида в течение 18 *ч* при комнатной температуре было модифицировано 8,5% цитозиновых, 30% урацильных и 9% гуаниновых звеньев (с образованием соответственно 5-иодцитозин-, 5-иодурацил- и 8-иодгуанинпроизводных) [25]. При обработке в тех же условиях цетавлоновой соли предварительно денатурированной ДНК реагировало 2% гуаниновых и 14% цитозиновых остатков. Для уяснения различия в реакционной способности оснований в составе нуклеиновых кислот при бромировании и иодировании необходимы дополнительные исследования. Следует, однако, отметить, что как при бромировании, так и при иодировании нуклеиновых кислот не наблюдается количественного галоидирования составляющих оснований даже при избытке галоидирующего агента. Возможно, что это является следствием существования какой-то вторичной структуры нуклеиновых кислот в органических растворителях. Действительно, если иодированию подвергается триметилгексадециламмониевая соль предварительно неденатурированной ДНК, то степень галоидирования значительно ниже (примерно в 4 раза), чем в случае обработки предварительно денатурированной ДНК.

При хлорировании триметилгексадециламмониевой соли рибосомальной и транспортной РНК из дрожжей в диметилформамиде N-хлорсукцинимидом основным процессом является разрушение гуанинового ядра, вероятно, с промежуточным образованием 8-хлоргуанина [28]. В меньшей степени модифицируются урацильные остатки (с образованием 5-хлорпроизводных) и совершенно не затрагиваются остатки цитозина и аденина. Закономерность, наблю-

даемая при бромировании РНК, таким образом, сохраняется и при хлорировании: гуанин и урацил в составе РНК оказываются самыми реакционноспособными основаниями.

2. Нитрование

Помимо галоидирования существует еще ряд реакций, приводящих к замещению по углеродным атомам гетероциклических оснований. Эти реакции, однако, требуют существенно более жестких условий. При действии (при температуре не выше 50° С) смеси концентрированных серной и азотной кислот на 2′,3′,5′-три-О-(динитробензоил)-уридин V образуется с выходом около 70% соответствующее 5-нитропроизводное VI. Из соединений VI после снятия динитробензоильной защиты был получен 5-нитроуридин VII [60].

В этих же условиях незащищенный уридин нитруется с одновременным окислением 5′-CH_2OH-группы рибозы, так что продуктом реакции является 5-нитроурацил-1-β-*D*-рибуроновая кислота VIII:

Восстановлением 5-нитропроизводных могут быть получены соответствующие 5-аминозамещенные соединения [60].

3. Оксиметилирование, аминометилирование и хлорметилирование

Реакция оксиметилирования оснований нуклеиновых кислот, хотя и не может, очевидно, быть применена для полинуклеотидов из-за жестких условий обработки, все же заслуживает здесь рассмотрения, поскольку она в какой-то мере моделирует процесс биосинтеза 5-оксиметилпроизводных из формальдегида и цитидиловой и уридиловой кислот [61–64]. Довольно хорошие выходы 5-оксиметилуридина IXа и 5-оксиметилдезоксиуридина IXб удается получить при кипячении нуклеозидов с формальдегидом в присутствии 0,5 н. соляной кислоты [65]. При более низкой температуре (50° С), использовании большого избытка формальдегида и при такой же кислотности среды [66] из дезоксиуридин-5′-фосфата практически количественно получается 5-оксиметилдезоксиуридин-5′-фосфат IXв.

$\xrightarrow{CH_2O(HCl)}$

IX

а ($R = H$; $R' = OH$)

б ($R = H$; $R' = H$)

в ($R = PO_3H_2$; $R' = OH$)

Реакция оксиметилирования, являясь электрофильной, должна сильно замедляться при протонировании основания; поэтому естественно, что цитидин, который в кислой среде находится в протонированной форме, в этих условиях не оксиметилируется [67]. Тем не менее, проводя превращение в щелочной среде, удается получить оксиметилированные цитидин- и дезоксицитидинмонофосфаты [67], и, хотя выходы здесь довольно низки (приблизительно 10%), реакция представляет значительный интерес вследствие труднодоступности 5-оксиметилпроизводных цитозина. Механизм и кинетика данной реакции исследованы пока еще недостаточно. Оксиметилирование производных урацила в щелочной среде также приводит к 5-оксиметилзамещенным соединениям, однако выходы продуктов низки [67], так что для производных урацила предпочтительнее обработка в кислой среде.

Реакция аминометилирования производных урацила протекает достаточно легко. Так, например, при нагревании в течение 7 *ч* при 100° С уридина и уридин-5′-фосфата [68, 69] со смесью диэтиламина и формальдегида образуются с выходами до 50% соответствующие 5-диэтиламинометилпроизводные X:

$(C_2H_5)_2NH$; CH_2O

X

а (R=H)
б ($R=PO_3H_2$)

Для самого урацила известна, кроме того, реакция хлорметилирования [70], однако для нуклеозидов и нуклеотидов она не применялась.

5-Оксиметил- и 5-аминометилпроизводные могут быть восстановлены до соответствующих 5-метилзамещенных соединений путем гидрирования над окисью платины [65, 68, 69] или над родием на окиси алюминия. Эта реакция представляется очень важной для получения 5-метилзамещенных нуклеозидов и нуклеотидов пиримидинового ряда. Помимо этого, 5-оксиметилпроизводные могут быть превращены в простые или сложные эфиры (по оксиметильной группе) или окислены до соответствующих альдегидов или кислот [65, 70]. В щелочной среде реакция оксиметилирования обратима: 5-оксиметильные производные, отщепляя формальдегид, медленно превращаются в исходные нуклеозиды или нуклеотиды [67].

4. Реакции с солями диазония

Нуклеозиды и нуклеотиды, основания которых содержат экзоциклические аминогруппы, способны к реакциям с солями диазония, в результате которых образуются диазоаминосоединения (см. стр. 423). В случае гуанозина (и, возможно, аденозина) [71] в условиях взаимодействия с солями диазония образуются также продукты замещения протонов, связанных с атомами С-8 пуринового ядра.

Так, например, при взаимодействии гуанозина с диазотированной *п*-сульфаниловой кислотой [71] при pH 9 с суммарным выходом около 50% образуются продукты замещения водорода на *п*-сульфофенильный остаток (XI и XII).

XI

XII

Не исключено, что в результате азосочетания получается также 8-азо-(*п*-сульфофенил)-гуанозин XIII; образование соединения XII, вероятно, является результатом разложения диазоаминопроизводного XIV.

XIII

XIV

Подобные реакции применялись для специфического маркирования гуанозина в ДНК [72] и РНК [73] с целью последующего электронно-микроскопического детектирования. Специфичность введения метки в гуанозин при этом могла быть достигнута благодаря двум обстоятельствам. Во-первых, скорость реакции гуанозина с солями диазония выше, чем скорость реакции других нуклеозидов. Так, при pH 9 диазотированная 2-аминофенил-1,4-дисульфокислота

реагирует с гуанозином в 60 раз быстрее, чем с любыми другими обычными нуклеозидами[74]. Во-вторых, образующийся продукт замещения при С-8 устойчив в кислой среде, тогда как диазоаминосоединения гидролизуются кислотой.

5. Реакции с N-арилгидроксиламинами и их производными

В отличие от самого гидроксиламина и его О-алкилпроизводных, которые в кислой и нейтральной средах реагируют с цитозиновым ядром (см. стр. 343), N-арилзамещенные гидроксиламины и их ацильные производные, по-видимому, специфически взаимодействуют с гуанином, давая продукты замещения протона при С-8[75–78]. В этом плане наиболее исследованной с химической точки зрения является реакция N-ацетокси-N-ацетил-2-аминофлуорена XV с гуанозином и дезоксигуанозином; при pH 7 и 37° С в водно-спиртовых растворах образуется 8-(N-флуоренилацетамидо)-гуанозин XVIа или замещенный дезоксигуанозин XVIб[75]:

XV

XVI

а ($R = OH$)

б ($R = H$)

Аналогичная реакция протекает, по-видимому, и с неацетилированным N-оксифлуорениламином XVII [76].

XVII

XVIII

Эти реакции, вероятно, являются реакциями электрофильного замещения, идущими по схеме [76]

$$Ar{-}N(R'){-}OR \overset{H^+}{\rightleftharpoons} Ar{-}N(R'){-}\overset{+}{O}(H){-}R \xrightarrow[-ROH]{} Ar{-}\overset{+}{N}(R') \xrightarrow{G} \text{Продукты}$$

R и R'—атомы водорода или различные радикалы

Как с первым [75, 77], так и со вторым реагентом [76] реакция по гуаниновому циклу наблюдается также на уровне денатурированной ДНК и РНК. Возможно, что эта реакция играет определенную роль в канцерогенных свойствах аминофлуоренов и их N-оксипроизводных.

6. Изотопный обмен атомов водорода

Другим типом реакций замещения в гетероциклическом ядре являются реакции изотопного обмена атомов водорода гетероциклических оснований нуклеиновых кислот на дейтерий и тритий. В данном разделе рассматриваются реакции обмена протонов, свя-

занных с углеродными атомами гетероциклического ядра (протоны, связанные с атомами азота, подвижны и обмениваются моментально).

Наиболее быстро обмениваются протоны, связанные с атомом С-8 пуриновых оснований. Так, при нагревании пурина, растворенного в D_2O, в течение 4 *ч* при 105° С в спектре ЯМР соединения исчезает пик, соответствующий протонам при С-8, тогда как сигналы протонов при С-2 и С-6 остаются неизменными [79]. Аналогично из двух протонов, связанных с углеродными атомами аденинового ядра, в аденозине обмену подвергается только протон при С-8 [80]. Скорость обмена протонов гуанозина при С-8 выше, чем скорость обмена протонов при С-8 аденинового ядра (рис. 5.1). При повышении pH от 2 до 11 скорость обмена увеличивается [81], а при более щелочных условиях (0,35 н. NaOH) происходит интенсивный обмен протонов при С-8 для обоих соединений. Реакция подчиняется закономерностям реакций первого порядка. Так же быстро при повышенных температурах происходит обмен протонов при С-8 остатков пуриновых оснований в составе аденозин-5′-фосфата, аденилил-(3′→5′)-аденозина, аденилил-(3′→5′)-гуанозина и гуанилил-(3′→5′)-гуанозина [81], а также в инозине. При 37° С в нейтральной среде скорость изотопного обмена пуриновых оснований мала и за несколько дней обмен проходит всего на несколько процентов. В то же время при повышенных температурах (100° С) обмен как в случае аденозина, так и в случае гуанозина заканчивается в течение нескольких часов (см. рис. 5.1). Это дает возможность использовать в биологических экспериментах, проводимых при температурах 30—40° С и нейтральных pH, меченые соединения, приготовленные обменом при высоких температурах. Мягкие условия изотопного обмена дают возможность получать меченные тритием нуклеозидтрифосфаты, например аденозин-5′-трифосфат [82], выдерживая аденозинтрифосфат в течение нескольких часов при 90° С в слабоосновной тритиевой воде. Механизм изотопного обмена в описанных случаях пока не выяснен.

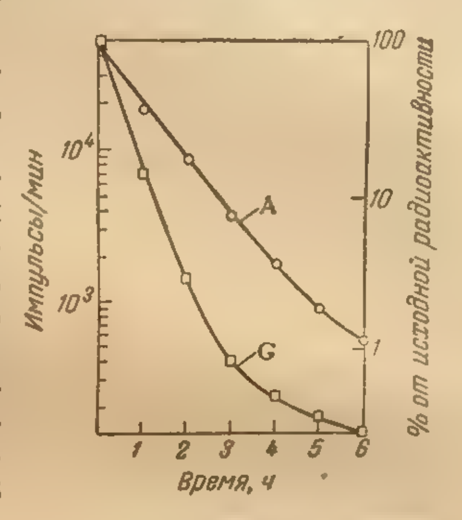


Рис. 5.1. Кинетика обмена 8-^{3}H-аденозина и 8-^{3}H-гуанозина с водой при 100° С и pH 7 [81].

Довольно быстро обмениваются протоны при С-5 в 5,6-дигидропроизводных урацила. Так, за 18 *ч* при комнатной температуре в растворе D_2O интенсивность сигнала в спектре ЯМР протонов при С-5 6-окси-5,6-дигидроуридин-5′-фосфата XIX значительно

уменьшается вследствие обмена на дейтерий[83]. При нагревании получающегося 5,5-дидейтеропроизводного XX образуется идентифицированный по ЯМР-спектру 5-дейтероуридин-5′-фосфат XXI:

XIX ⇌ (D_2O) XX → ($-D_2O(H_2O)$) XXI

R-фосфатная группа

Аналогичный обмен происходит и с тритием[83]. По-видимому, такая реакция вполне возможна и в случае 5,6-дигидропроизводных цитидина. Реакция, очевидно, может быть применена для получения меченных дейтерием и тритием пиримидиновых нуклеотидов.

В отличие от рассмотренных случаев обмен протонов в производных пиримидиновых оснований в отсутствие катализатора протекает только в очень жестких условиях[84–86], причем водород, связанный с атомом С-5, оказывается значительно более подвижным, чем водород, связанный с атомом С-6. Так, например, при 100° С в 1 н. серной кислоте период полуобмена трития, связанного с С-5 уридина, составляет 0,5 дня, тогда как обмена трития, связанного с атомом С-6, не было обнаружено даже после двух недель подобной обработки[84]. Протоны тимина в этих условиях практически не обмениваются. Атом водорода при С-5 цитидина обменивается в подобных условиях значительно медленнее, чем у уридина (период полуобмена в случае цитидина 6 дней). При обработке 2 н. гидроокисью бария при 100° С цитидин проявляет бо́льшую по сравнению с уридином реакционную способность[84], однако в условиях, применяемых для такого обмена, происходит гидролиз N-гликозидных связей и дезаминирование цитидина (в щелочной среде). Поэтому для приготовления меченых пиримидиновых производных используют обмен в присутствии палладиевого катализатора[87] (*18 ч* при 100° С).

Специфический изотопный обмен протонов при атомах углерода цикла в пиримидиновых производных наблюдается в присутствии кислотных или основных гомогенных катализаторов. В кислом ци-

тратном буфере протоны при атоме С-5 цитидина при 95° С в растворе D_2O обмениваются на дейтерий, причем скорость обмена возрастает с увеличением концентрации цитратного буфера [88]. Скорость обмена, кроме того, зависит от кислотности среды и имеет максимальное значение при pD 4,9 (константа скорости реакции первого порядка при pD 4,9 и концентрации цитратного буфера 0,5 *моль/л* равна 0,12 $ч^{-1}$). Каталитическое влияние цитрата связано, возможно, с протеканием равновесной реакции присоединения цитратного аниона по двойной связи С-5—С-6 цитидина:

R—остаток рибозы

Реакция должна облегчаться при протонировании цитозинового ядра при понижении pH; вместе с тем скорость ее должна возрастать с увеличением концентрации анионов Bas^- при увеличении pH. Эти два противоположные процесса и приводят, по-видимому, к возникновению оптимума pH для скорости обмена.

В отличие от цитозиновых производных производные урацила не обменивают протоны при атомах углерода цикла в присутствии кислых буферов [89]. Однако в присутствии таких оснований, как 2-меркаптоэтиламин, этаноламин, этиламин или едкий натр [89], происходит обмен водорода, связанного с атомом С-5 урацила, как это было показано на примере уридина, дезоксиуридина и уридинмонофосфатов. Изотопный обмен протекает в довольно мягких условиях и при использовании в качестве катализатора меркаптоэтиламина полностью заканчивается за 21 день при комнатной температуре или за 4 дня при 60° С. Цитидин в этих условиях нереакционноспособен [89]. Это приводит к предположению, что реакция происходит по механизму 1,4-присоединения катализатора с участием карбонильной группы урацила согласно следующей схеме:

R—остаток углевода или углеводофосфата

Реакции изотопного обмена пиримидиновых производных под действием катализаторов могут оказаться полезными для получения меченных тритием нуклеозидов и нуклеотидов.

Изотопный обмен водородных атомов гетероциклических оснований происходит также и в полинуклеотидах. Например, в растворах ДНК в D_2O[342] и T_2O[90, 345] после быстрого обмена подвижных протонов наблюдается медленный обмен, обусловленный замещением атомов водорода, связанных с атомами С-8 пуринов[90, 342]. На скорость изотопного обмена, по-видимому, влияет вторичная структура полинуклеотидов. Так, скорость обмена протонов аденинового ядра уменьшается в ряду

аденозин-5′-фосфат > одноцепочечная полиадениловая кислота >

> комплекс (поли-А) · (поли-U)[343, 344]

Из других реакций замещения у углеродных атомов гетероциклического ядра следует отметить реакцию образования 8-нитроксантозина, которая протекает как побочный процесс при дезаминировании гуанозина азотистой кислотой (см. стр. 418). При дезаминировании аденозина подобного замещения не наблюдается[91].

7. Реакции присоединения по двойной связи С-5—С-6 пиримидиновых производных

Все рассмотренные выше реакции представляют собой реакции непосредственного замещения в гетероциклическом ядре оснований нуклеиновых кислот. Однако в случае пиримидиновых оснований, обладающих реакционноспособной двойной связью С-5—С-6, известны также реакции, приводящие к насыщению этой связи. Некоторые из них применяются для исследования структуры нуклеиновых кислот, другие — для исследования связи между их структурой и функцией. Рассмотрим эти реакции подробнее.

Галоидирование в водной среде

Одной из наиболее применимых в химии нуклеиновых кислот реакций присоединения по двойной связи ядра оснований является реакция галоидирования в водной среде. Наиболее исследованным, по-видимому, является бромирование. При действии водных растворов брома на урацил и его нуклеозиды и нуклеотиды[92–94], а также на соответствующие производные цитозина[37] на первой стадии реакции образуются 5-бром-6-окси-5,6-дигидропиримидиновые производные XXII, которые при нагревании или под действием кислоты[37]

в присутствии избытка брома могут отщеплять элементы воды и подвергаться дальнейшему бромированию:

$-H_2O$

XXII

Br_2; H_2O

XXIII

Скорость образования дибромпроизводного XXIII зависит от скорости дегидратации монобромпроизводного XXII, которая для нуклеозидов при низких температурах довольно мала. Так, например, при комнатной температуре и pH 2 за 24 *ч* всего 10% 5-бром-6-окси-5,6-дигидроуридина XXII превращается в 5-бромуридин[94]. Вследствие этого при низких температурах и непродолжительном времени бромирования в основном образуются дигидросоединения, содержащие один атом брома[94]. Для получения производных типа XXIII необходимы либо длительное воздействие с использованием избытка брома, либо более высокая температура реакции. При бромировании производных тимина конечным продуктом реакции является 5-бром-6-окси-5,6-дигидротимин[95]; бромирование бромной водой в этом случае протекает практически мгновенно даже при комнатной температуре.

Несколько медленнее, но с образованием тех же веществ идут реакции пиримидиновых гетероциклических оснований (и их производных) с N-бромсукцинимидом[37]. Поскольку реакция с бромом

как при галоидировании цитозинового, так и урацильного ядра в составе нуклеозидов протекает практически мгновенно, не удается обнаружить какой-либо избирательности. Однако при галоидировании оснований в составе полинуклеотидов все же наблюдается некоторая специфичность реакции. Так, при бромировании РНК вируса табачной мозаики [37] при pH 7 было найдено, что наиболее реакционноспособным основанием является цитозин, тогда как при pH 9 в отношении присоединения по двойной связи более реакционноспособен урацил. Это согласуется с электрофильным характером реакции галоидирования — при нейтральных значениях pH более реакционноспособным должно быть нейтральное ядро цитозина, при щелочных — анионы урацила и гуанина.

В случае более медленно реагирующего в водных растворах N-бромсукцинимида [37] специфичность действия удается проследить уже на уровне мономеров: при pH 7 и 0° С из нуклеотидов с наибольшей скоростью галоидируется цитидиловая кислота.

Реакция с N-бромсукцинимидом в определенной степени специфична по отношению к вторичной структуре нуклеиновых кислот. Так, при бромировании этим реагентом аланиновой тРНК [96] из дрожжей наиболее реакционноспособными оказываются основания в составе петлевых участков этой молекулы (см. стр. 291). Бромирование нуклеотидов в составе ДНК [97–99], по-видимому, приводит в итоге к тем же продуктам, которые получаются в случае мономерных производных.

В оксигалоиддигидропроизводных пиримидинов атом галоида, находящийся у насыщенного углеродного атома, более реакционноспособен, чем в сопряженных 5-галоидпиримидинах. Это дает возможность использовать такие соединения в качестве исходных веществ для получения 5-замещенных аналогов пиримидиновых производных. Так, при пропускании раствора 5-бром-6-окси-5,6-дигидроцитидина через анионнообменную смолу в OH-форме был получен 5-оксицитидин [99], при нагревании 5-бром-6-окси-5,6-дигидроуридина с избытком пиридина — 5-оксиуридин [45].

N-Гликозидная связь в соединениях типа XXII и XXIII, как и вообще в дигидропиримидиновых нуклеозидах, более лабильна в кислой среде по сравнению с аналогичными производными пиримидинов с ненасыщенной связью С-5—С-6. Используя это обстоятельство, бромирование в водных растворах применяют в качестве предварительной операции при определении рибозы или дезоксирибозы в пиримидиновых нуклеозидах и нуклеотидах, для чего необходимым условием является гидролиз N-гликозидной связи [100–102].

При галоидировании в водных растворах происходит насыщение двойной связи С-5—С-6 пиримидинов и разрушение гуанина (см. стр. 315); соответственно исчезает характерное для этих оснований ультрафиолетовое поглощение в длинноволновой области, тогда как адениновое ядро остается неизменным. На этом основа-

нии данную реакцию можно применить для определения нуклеотидного состава двухспиральных полинуклеотидов спектральным способом [103]. Галоидирование в водных растворах довольно широко используется при функциональных исследованиях нуклеиновых кислот [104–106].

Окисление четырехокисью осмия и перманганатом калия

Реакция с четырехокисью осмия, широко применяемая в органической химии для окисления двойных связей [107], была использована также для окисления двойных связей пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот [108–111].

Если окисление проводится в растворах, содержащих аммиак, активным агентом является, по-видимому, комплекс OsO_4 с аммиаком [365]; в отсутствие аммиака окисление протекает медленнее [108, 365].

При проведении реакции с нуклеозидами в 0,4 н. растворе аммиака [109] было найдено, что при концентрации OsO_4 $7 \cdot 10^{-3}$ *M* при 0° С реагируют только пиримидиновые производные. Тимидин реагирует с максимальной скоростью, окисляясь полностью за несколько минут; пуриновые производные не модифицируются. Относительные скорости реакции различных пиримидиновых нуклеозидов с четырехокисью осмия в указанных условиях приводятся ниже [109].

Дезоксицитидин	1	5-Метилдезоксицитидин	13
Цитидин	1,8	5-Бромдезоксиуридин	13
Дезоксиуридин	2,8	Тимидин	45
Уридин	4,5		

Таким образом, в данных условиях скорость реакции возрастает при переходе от дезоксирибо- к рибопроизводным и от незамещенных к 5-замещенным соединениям. Скорость модификации нуклеотидов мало отличается от скорости модификации нуклеозидов; бо́льшая скорость модификации тимина наблюдается также и в случае олигонуклеотидов, содержащих тимин и цитозин [109]. Исследование кинетики реакции с четырехокисью осмия показывает [108], что с увеличением pH скорость реакции с пиримидиновыми нуклеозидами увеличивается, но при всех значениях pH тимин модифицируется значительно быстрее, чем цитозин *. Хотя структура конечного продукта реакции пиримидиновых производных с четырехокисью осмия в работах [108, 109] специально не исследовалась, можно полагать, что по крайней мере на первых стадиях реакции

* В работе [108] при проведении реакции при pH 7 и 23° С было найдено, что в отличие от приведенных выше данных бромурацил модифицируется медленнее, чем урацил. Причина такого отклонения не ясна; вероятно, она связана с различной для разных оснований зависимостью скорости реакции от pH.

образуются *цис*-5,6-диокси-5,6-дигидропиримидины XXV, являющиеся продуктами гидролиза циклического эфира осмиевой кислоты XXIV:

XXIV

XXV

R–остаток углевода

5,6-Диокси-5,6-дигидротимидин был выделен и идентифицирован при обработке тимидина водным раствором четырехокиси осмия в присутствии перхлората бария [110]. Если при проведении реакции в водных растворах не удается обнаружить циклического эфира XXIV, то при обработке в бензоле [111] в случае 3′,5′-диацетилтимидина был выделен аддукт, содержащий эквимольное количество осмия. Строение этого соединения, по-видимому, соответствует циклическому эфиру XXIV. В нейтральных водных растворах аддукты тимидина, содержащие осмий, обнаруживаются в присутствии цианид-ионов [111]. В этом случае циклический эфир XXIV, по-видимому, стабилизуется за счет комплексообразования (аддукт содержит 1 *моль* осмия и 2 *моль* цианида на 1 *моль* тимидина). Поскольку специфичность по отношению к тимину сохраняется, реакция с четырехокисью осмия в присутствии цианидов может быть использована для специфического маркирования тимина тяжелым атомом осмия с целью детектирования его распределения в природных полинуклеотидах методом электронной микроскопии. Специфичность взаимодействия с тимином сохраняется и в случае денатурированной ДНК [108, 109, 111]. С нативной ДНК реакции наблюдать, однако, не удалось [108]; очевидно, здесь проявляется влияние вторичной структуры. При модификации четырехокисью осмия в присутствии цианистого калия расщепления полинуклеотидной цепи не наблюдается [346]. В случае тРНК [112] окисление пиримидинов происходит, по-видимому, только по односпиральным участкам.

Образование 5,6-диокси-5,6-дигидротимидина в качестве промежуточного продукта наблюдалось также при окислении тимидина перманганатом калия в водном растворе (при 37° С и pH 8,5) [113]. При окислении тимина перманганатом калия была обнаружена 5-метил-5-оксибарбитуровая кислота [347]. Не исключено, что это соединение образуется также и при окислении тимидина. По-видимому, 5,6-диокси-5,6-дигидропиримидины в качестве промежуточных продуктов образуются при окислении перманганатом также и других пиримидиновых производных. Однако выделить их не удает-

ся, возможно, вследствие того что на последующей стадии происходит быстрое расщепление пиримидинового цикла (см. стр. 473). Перманганат калия разрушает гуаниновое ядро, но не затрагивает адениновое. Более подробно реакция с перманганатом рассмотрена в гл. 7 (см. стр. 473).

Продукты присоединения по двойной связи пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот образуются в качестве промежуточных также при расщеплении гетероциклического ядра под действием перекиси водорода, перекисей органических кислот и рентгеновского излучения. Эти реакции рассматриваются в гл. 7 (см. стр. 478); фотохимическое присоединение по двойной связи обсуждается в гл. 12 (см. стр. 631). Следует упомянуть, кроме того, внутримолекулярное присоединение гидроксильной группы сахара по двойной связи пиримидиновых оснований, наблюдаемое при иодировании нуклеозидов в присутствии иодноватой кислоты (см. стр. 314). В результате такого присоединения при иодировании дезоксицитидина образуется 5,5-дииод-5,6-дигидро-6-оксициклодезоксиуридин[23] I, а из 1-(β-*D*-арабинофуранозил)-цитозина в аналогичных условиях образуется 5,5-дииод-5,6-дигидро-6-оксициклопроизводное XXVI[114]. Аналогично реагирует 2′,3′-изопропилиден-5′-тиоуридин, который при обработке кислотой образует[115] продукт XXVII:

I

$\xrightarrow{I_2;\ HIO_3}$

XXVI

$\underset{OH^-}{\overset{H^+}{\rightleftarrows}}$

XXVII

8. Восстановление

Пиримидиновые производные. Двойная связь в пиримидиновых основаниях (свободных или в виде производных) может быть насыщена также путем восстановления. Первые исследования по восстановлению пиримидиновых нуклеозидов были выполнены в связи с проблемой идентификации остатка сахара, входящего в состав этих соединений. N-Гликозидная связь в пиримидиновых нуклеозидах довольно устойчива к действию кислот (см. гл. 8), что сильно затрудняет выделение недеградированного углеводного фрагмента. Гидролиз N-гликозидной связи существенно облегчается при нарушении ароматичности системы пиримидинового кольца, в частности при восстановлении пиримидиновых производных [116].

Восстановление пиримидиновых нуклеозидов может быть осуществлено действием натрия в спирте и жидком аммиаке [117]. Более общим методом является действие амальгамы натрия в воде [118] или уксусной кислоте [119]; в этих случаях удается добиться восстановления как нуклеозидов, так и нуклеотидов. Из дезоксиуридина и тимидина при этом образуются дезоксирибозиды дигидропиримидинона-2 (XXVIIIa) и 5-метилдигидропиримидинона-2 (XXVIIIб):

Na/Hg (CH_3COOH)

XXVIII

а (R′ = H) } R — остаток
б (R′ = CH_3) } 2′-дезоксирибозы

Эти соединения, однако, были выделены лишь с небольшим выходом, и помимо них в реакционной смеси присутствуют еще по крайней мере четыре вещества.

Гораздо более однозначные результаты получаются при каталитическом гидрировании пиримидиновых рибонуклеозидов. Легче всего гидрирование протекает над родием на окиси алюминия [120–122]; реакцию можно проводить в присутствии в качестве катализатора пластины на окиси алюминия [123], коллоидной платины [124] и коллоидного палладия [116]; в последнем случае восстановление протекает очень медленно. Гидрирование уридина и его производных в нейтральной или слабокислой среде заканчивается после по-

глощения одного моля водорода [120, 121]; в результате образуются соответствующие производные 5,6-дигидроуридина XXIX [120, 121, 123–126].

H_2; Rh

XXIX

R — остаток рибозы

Реакция протекает быстро в водных растворах при комнатной температуре и атмосферном давлении. Гидрирование производных уридина резко замедляется в присутствии аденозина [120] или α-метилглюкозида [127]. Аналогичное уменьшение скорости гидрирования наблюдается при переходе от уридин-5'-фосфата к уридиндифосфатглюкозе [127]. Этот эффект может быть следствием внутримолекулярного взаимодействия гетероциклического основания и остатка сахара в молекуле нуклеозиддифосфатуглевода.

При исчерпывающем гидрировании уридина над родиевым катализатором в щелочной среде наряду с 5,6-дигидроуридином XXIX образуется 3,4,5,6-тетрагидроуридин XXX [128]. Это соединение может быть получено также при восстановлении 5,6-дигидроуридина боргидридом натрия в мягких условиях [128]; в более жестких условиях происходит расщепление пиримидинового цикла с образованием производных 3-уреидопропанола-1 (XXXI) [129, 130].

XXIX XXX XXXI

R — остаток рибозы

Аналогично уридину протекает и восстановление тимидина [121, 128]. Насыщение 5,6-двойной связи при гидрировании над родиевым катализатором происходит стереоспецифически, так что образуется *L*-изомер XXXII [131]; при дальнейшем его восстановлении действием боргидрида натрия и обработке метанолом выделены производное

2-метил-3-уреидопропанола-1 XXXIII и метиловый эфир тетрагидротимидина XXXIV.

XXXII XXXIII XXXIV

Сложнее обстоит дело при гидрировании цитидина и его производных. В этом случае реакция не останавливается после поглощения одного моля водорода, а происходит дальнейшее восстановление. Кроме того, аминогруппа в производных 5,6-дигидроцитидина крайне легко замещается под действием нуклеофильных агентов (см. стр. 355), в частности воды.

Тем не менее при тщательном контроле условий гидрирования и проведении реакции при низкой температуре удается превратить цитидин [122], дезоксицитидин [122] и цитидин-2′,3′-циклофосфат [132] в соответствующие 5,6-дигидропроизводные XXXV; в водных растворах эти соединения легко дезаминируются с образованием производных 5,6-дигидроуридина. При восстановлении цитидин-2′(3′)-фосфата [120] и цитидин-5′-фосфата [122] образующиеся фосфаты 5,6-дигидроуридина являются практически единственным продуктом реакции.

$\xrightarrow{H_2;\ Rh}$ XXXV $\xrightarrow{H_2O}$ XXIX

R — остаток рибозы, 2′-дезоксирибозы или рибозофосфата

Исчерпывающее гидрирование цитидина над родиевым катализатором приводит к смеси тетрагидроуридина XXX и производного гексагидропиримидинона-2 (XXXVIII) [128]; промежуточным продук-

том при этом, очевидно, является тетрагидроцитидин XXXVI.

XXXV XXXVI XXX

XXXVIII

R — остаток рибозы

При восстановлении цитидина над платиновым катализатором в качестве единственного продукта реакции образуется производное XXXVIII [128, 133]. Уридин, тимидин и цитидин могут быть восстановлены электрохимически на капельном ртутном катоде [134]; удалось подобрать условия для препаративного получения из цитидин-2′(3′)-фосфата 5,6-дигидроцитидин-2′(3′)-фосфата.

Каталитическое гидрирование пиримидиновых нуклеозидов — редких компонентов РНК-изучено слабо. Отмечено исчезновение характерного УФ-поглощения при 260 *ммк* при восстановлении 3-N-метилуридин-5′-фосфата [127], однако продукт реакции выделен не был. При гидрировании псевдоуридина образуется 5-рибитилурацил [135].

Некоторые из редких компонентов тРНК способны восстанавливаться под действием боргидрида натрия. Восстановление 5,6-дигидроуридина уже рассматривалось выше. 4-*экзо*-N-Ацетилцитидин легко переходит при реакции с боргидридом натрия в тетрагидропроизводное XXXVII, одновременно протекает деацетилирование (см. стр. 406), приводящее к цитидину.

XXXVII

R — остаток рибозы

Восстановление 3-N-метилцитидина под действием боргидрида натрия сопровождается исчезновением характерного ультрафиолетового поглощения соединения и отщеплением аммиака[137]. При восстановлении 4-тиоуридина образуется 1-рибозилгексагидропиримидинон-2 (XXXVIII). Это соединение получено при действии боргидрида натрия[138] и никеля Ренея[139]. 2-Тиоуридин при обработке боргидридом натрия не восстанавливается[130]; при действии же скелетного никелевого катализатора образуется 1-(β-*D*-рибофуранозил)-дигидропиримидон-4 (XXXIX)[140].

XXXVIII XXXIX

R — остаток рибозы

Взаимодействие редких нуклеозидов РНК с боргидридом натрия протекает в мягких условиях и может быть использовано для специфической модификации тРНК, поскольку уридин и цитидин не вступают в эту реакцию. При облучении УФ-светом уридин, однако, восстанавливается боргидридом натрия с образованием 5,6-дигидроуридина (см .стр. 636).

Пуриновые производные. Пуриновое ядро в нуклеозидах весьма устойчиво к действию восстанавливающих агентов. Оно не гидрируется над платиновыми и палладиевыми катализаторами; воздействие родиевого катализатора, оказавшегося столь эффективным при гидрировании пиримидинов, остается пока неисследованным.

Обработка аденозина натрием в жидком аммиаке приводит к исчезновению характерного ультрафиолетового поглощения соединения[117]; строение продуктов реакции не изучалось. Единственным хорошо исследованным примером химического восстановления пуриновых нуклеозидов является превращение 1-метиладенозина под действием боргидрида натрия[137] в 1-метил-1,6-дигидроаденозин XL:

$\xrightarrow{NaBH_4}$ XL $\xrightarrow{O_2(OH^-)}$

R — остаток рибозы

Реакция протекает достаточно быстро при pH 8,2; с увеличением основности среды скорость восстановления уменьшается. Продукт реакции легко окисляется под действием нитрита натрия при pH 5,4; в щелочной среде происходит окисление под действием кислорода воздуха, которое сопровождается перегруппировкой Димрота (см. стр. 450) и приводит к 6-*экзо*-N-метиладенозину.

Описано электрохимическое восстановление аденина и гипоксантина [141]. Конечными продуктами восстановления являются производные имидазола XLIV и XLVI. В случае аденина найдены три промежуточных продукта: дигидропроизводное XLI, легко окисляющееся под действием кислорода воздуха в аденин, и два тетрагидропроизводных XLII и XLIII.

Для гипоксантина показано, что имеется по крайней мере один промежуточный продукт — по-видимому, дигидропроизводное XLV.

Электрохимическое восстановление аденозина и его фосфатов протекает в условиях, практически идентичных условиям восстановления аденина [142]; это позволяет предполагать аналогичный механизм реакции. Интересно отметить, что в условиях гладкого

восстановления аденозиндифосфата не происходит восстановления не только инозин- и гуанозиндифосфатов, но и крайне легко восстанавливающихся пиримидиновых производных — уридиндифосфата и цитидиндифосфата. Было выдвинуто предположение о промежуточном образовании дигидропроизводных аденозиндифосфата типа XLI при окислительном фосфорилировании в митохондриях [143].

Олиго- и полинуклеотиды. Для модификации полинуклеотидов представляют интерес две реакции восстановления компонентов нуклеиновых кислот, протекающие в мягких условиях: каталитическое гидрирование пиримидиновых нуклеозидов и действие боргидрида натрия, приводящее к восстановлению некоторых редких компонентов РНК.

Остаток уридина в коротких олигонуклеотидах, например в ApU, UpG, UpdGpdGp$\overset{H}{U}$ и олигоуридиловых кислотах, может быть прогидрирован до остатка 5,6-дигидроуридина [124, 132], хотя реакция идет медленнее, чем для самого уридина, и в некоторых случаях возникают трудности, связанные с сильной адсорбцией вещества на катализаторе. В случае полинуклеотидов гидрирование уридиновых звеньев практически полностью ингибируется. Остатки уридина в полинуклеотидах тем не менее могут быть превращены в остатки 5,6-дигидроуридина специфическим фотохимическим восстановлением (см. гл. 12); эта реакция довольно широко используется для функциональных исследований тРНК.

В противоположность рассмотренному восстановление редких компонентов нуклеиновых кислот под действием боргидрида натрия гладко протекает как на мономерном, так и на полинуклеотидном уровне [130, 136]. Предложено использовать восстановление $NaBT_4$ для количественного определения остатков 5,6-дигидроуридина и 4-тиоуридина в полинуклеотидах [138].

9. Реакции с нуклеофильными реагентами, проходящие без расщепления цикла

Для исследования функциональных свойств нуклеиновых кислот особое значение имеют реакции гетероциклических оснований нуклеиновых кислот с реагентами нуклеофильного типа. Если рассмотренные до сих пор реакции сводились либо к замещению атомов водорода гетероциклической системы, либо к присоединению по двойной связи гетероциклического ядра, то при реакции с нуклеофильными агентами наблюдается замещение имеющихся в ядре функциональных групп (заместителей), а именно аминогрупп. Наряду с непосредственным замещением аминогруппы в случае пиримидиновых оснований происходит также и присоединение по двойной связи с последующим замещением аминогруппы.

Реакции нуклеофильного замещения в ряду нуклеиновых кислот исследованы значительно лучше, чем рассмотренные ранее реак-

ции. Во многих случаях проведены сравнительные кинетические исследования, найдены оптимальные условия проведения реакций и сопоставлены скорости модификации различных оснований. Как и следовало ожидать из теоретических положений (см. гл. 3), скорость модификации цитозинового ядра нуклеофильными реагентами значительно выше скорости модификации других аминооснований в составе нуклеозидов и нуклеотидов; доступные по литературе сведения в основном касаются именно реакции с цитозиновым ядром.

Наиболее распространенными нуклеофильными реагентами, применяемыми для модификации оснований, являются гидроксиламин и О-алкилзамещенные гидроксиламины, а также гидразин и его производные.

Действие гидроксиламина и его О-алкилпроизводных

Реакции гидроксиламина с компонентами нуклеиновых кислот исследованы значительно глубже других реакций и являются в настоящее время наиболее разработанными в теоретическом и препаративном отношении реакциями химической модификации рассматриваемого класса соединений. Сам гидроксиламин в зависимости от pH реакционной среды проявляет различную специфичность по отношению к основаниям нуклеиновых кислот: при кислых и нейтральных значениях pH он реагирует в основном с цитозиновым ядром, а при щелочных — с урацильным ядром [144, 145]. Взаимодействие с производными урацила приводит в конечном итоге к расщеплению гетероцикла и рассматривается в гл. 7 (см. стр. 468). Реакция с цитозиновым ядром в составе нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов рассмотрена ниже.

Специфичность О-алкилпроизводных гидроксиламина значительно выше — эти соединения не реагируют с производными урацила даже в щелочной области [146], что обусловлено, вероятно, участием в реакции как гидроксильной, так и аминной функциональных групп гидроксиламина (см. стр. 467). Гуаниновое ядро гидроксиламином и его О-алкилпроизводными, по-видимому, не модифицируется, а модификация аденина идет со значительно меньшей скоростью по сравнению с производными цитозина (см. стр. 348).

Скорость модификации производных цитозина зависит от основности реакционной смеси и имеет максимальное значение при pH 6 для гидроксиламина [144, 145] и при pH 5,1 для О-метилгидроксиламина [147]. Существование оптимума pH объясняется, вероятно, тем, что реакция в основном обусловлена взаимодействием протонированной молекулы производного цитозина с нейтральной молекулой реагента. Расхождение между наблюдаемыми оптимальными значениями pH и вычисленными исходя из значений pK_a реагентов [148, 149] объясняется, возможно, сложным характером реакции.

При реакции производных цитозина с гидроксиламином и О-метилгидроксиламином основными продуктами реакции, обнаруживаемыми в реакционной смеси, являются соответствующие 4,6-ди-(оксиамино)-5,6-дигидро-2-оксопроизводные XLVII и 4-оксиамино-2-оксопроизводные XLVIII [145, 146, 150–152].

XLVII XLVIII

R — остаток углевода или углеводофосфата

R′ = H или CH_3

Образование этих продуктов объясняется установленным недавно [150–152] механизмом реакции, включающим две параллельные стадии:

1) присоединение реагента по двойной связи цитозинового ядра с последующим замещением лабильной аминогруппы в образующемся производном дигидроцитозина (XLIX); 2) непосредственное замещение аминогруппы цитозина на оксиаминогруппу.

k_1, k_{-1}, k_2, k_4

XLIX XLVII XLVIII

R — остаток углевода или углеводофосфата

R′ = H или CH_3

Приводимая схема является первым приближением более общей схемы

Производное цитозина $\underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}}$ XLIX $\xrightarrow{k_2}$ XLVII

Производное цитозина $\xrightarrow{k_4}$ XLVIII $\underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}}$ XLVII

принятым, поскольку k_3 и k_{-3} значительно меньше общей константы скорости исчезновения цитидина в реакционной смеси.

Протекание превращения по этим двум направлениям отвечает распределению электронной плотности в цитозиновом ядре (см. стр. 149), согласно которому нуклеофильной атаке должны подвергаться атомы С-6 и С-4. Прямое замещение аминогруппы в цитозиновом ядре при реакции с гидроксиламинами доказывается тем, что в реакционной смеси всегда образуются значительные количества соединений типа XLVIII, тогда как дигидропроизводное типа XLVII в условиях реакции (в интервале pH 3—7) лишь очень медленно отщепляет гидроксиламин, превращаясь в XLVIII[51]. Оценка констант скоростей отдельных стадий реакции[153, 154] цитидина с гидроксиламином и O-метилгидроксиламином показывают, что скорость присоединения по двойной связи C-5—C-6 значительно выше скорости непосредственного замещения аминогруппы. Тем не менее благодаря обратимости первой стадии реакции присоединения, варьируя условия, можно менять относительный выход продуктов, добиваясь преимущественного образования XLVII или XLVIII. Из кинетического анализа схемы реакции следует, что отношение выходов соединений XLVIII и XLVII должно быть пропорционально обратной концентрации гидроксиламина в соответствии с уравнением

$$\frac{[\text{XLVIII}]}{[\text{XLVII}]} = \frac{k_4^0}{k_1^0} \cdot \frac{k_{-1}}{k_2^0} \cdot \frac{1}{[\text{NH}_2\text{OR}]} + \frac{k_4^0}{k_1^0}$$

где k_1^0, k_2^0 и т. д. — константы скорости реакции второго порядка, полученные делением определяемых экспериментально констант скорости псевдопервого порядка на концентрацию гидроксиламина.

Это обстоятельство дает возможность изменять в широких пределах соотношение продуктов реакции, соответственно понижая или повышая концентрацию гидроксиламина. Экспериментальные данные подтверждают, что отношения концентраций продуктов реакции XLVIII и XLVII действительно линейно зависят от обратной концентрации гидроксиламинов (рис. 5.2). Найдено[153, 154], что

выход продукта XLVIII увеличивается при понижении pH и ионной силы реакционной смеси и при повышении температуры реакции.

Пользуясь установленными закономерностями, можно провести практически количественное превращение цитозиновых ядер до соединений типа XLVII или до XLVIII. Так, например, обработкой цитидин-5′-трифосфата 7 *М* раствором гидроксиламина при pH 6,5 и 30° С был получен модифицированный нуклеозидтрифосфат, соответствующий XLVII (R′=H), тогда как обработка 1 *М* раствором гидроксиламина при pH 5 и 50° С приводила к трифосфату XLVIII (R′ = H). Аналогично реакцией с гидроксиламином были получены также полинуклеотиды, содержащие модифицированные звенья либо типа XLVII, либо XLVIII [155].

Описанная недавно реакция цитидина с O-(β-диэтиламиноэтил)-гидроксиламином [156], по-видимому, протекает подобным же образом. Для модификации цитозинового ядра применялся также O-бензилгидроксиламин [158], который, однако, не получил широкого распространения из-за плохой растворимости в воде.

Сходный механизм реакции с гидроксиламинами предлагается и для таких производных цитидина, как 4-*экзо*-N-метил- Lа, 4-*экзо*-N,N-диметил- Lб, 3-N-метилцитидины LI, а также для их 5′-фосфатов.

L

LI

а (R = H, R′ = CH_3)
б (R = R′ = CH_3)

Однако соотношение продуктов типа XLVIII и XLVII в случае реакции указанных N-производных существенным образом меняется по сравнению с цитидином (как показано на примере реакции 5′-фосфатов соединений с 2,5 *М* раствором O-метилгидроксиламина при pH 4,9 и 30° С) [157]:

Соединение	Выход XLVIII/Выход XLVII
Цитидин	0,36
4-*экзо*-N-Метилцитидин . . .	0,20
4-*экзо*-N, N-Диметилцитидин .	XLVIII не обнаружен
3-N-Метилцитидин	0,47

Выход продукта типа XLVII увеличивается при введении заместителя в экзоциклическую аминогруппу и уменьшается при метилировании циклического азота N-1.

Результаты, полученные при исследовании реакции 4-*экзо*-N-замещенных аналогов цитозина с гидроксиламинами, по-видимому, объясняются не только различием pK_a этих соединений, но и

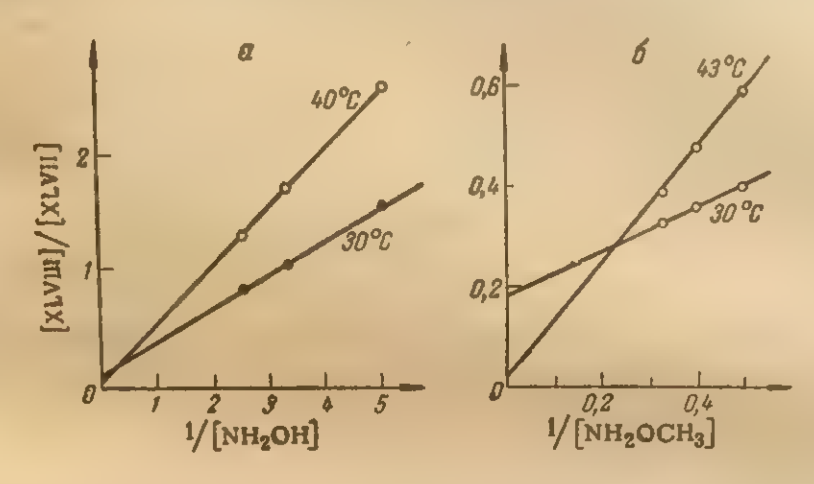


Рис. 5.2. Реакция цитидина с гидроксиламином (*а*) и О-метилгидроксиламином (*б*). Зависимость отношения концентраций продуктов XLVIII и XLVII в конце реакции от обратной концентрации гидроксиламина при различной температуре [153, 154]:
а — pH 6, μ = 1; *б* — pH 4,9, μ = 3.

увеличением степени сопряжения аминогруппы с ядром при введении в нее алкильных заместителей. С другой стороны, введение сопряженного с ядром заместителя в положение 5 или 6 пиримидинового цикла должно затруднять присоединение по двойной связи С-5—С-6, поскольку для выведения из сопряжения таких заместителей необходима дополнительная энергия. По-видимому, определенную роль в подобных реакциях могут играть также пространственные факторы. При модификации гидроксиламином 5-метил-, 6-метил- и 5-оксиметилпроизводных цитозина наблюдается только непосредственное замещение экзоциклической аминогруппы [159]. Очевидно так же протекает реакция и в случае соответствующих нуклеозидов и нуклеотидов, однако исследований в этом направлении проведено не было. Следует отметить, что в случае незамещенного гидроксиламина, если он используется для модификации в низких концентрациях (10^{-3} — 10^{-2} *M*), наблюдаются побочные эффекты, связанные с разложением реагента. Продукты разложения гидроксиламина неспецифически разрушают все (кроме аденина) гетероциклические основания нуклеиновых кислот [160—162] (см. стр. 478).

Со значительно меньшей скоростью (по сравнению с цитозиновыми и урацильными ядрами) гидроксиламин и

О-метилгидроксиламин реагируют с ядром аденина[163]. В табл. 5.3 приводятся величины констант скорости реакции второго порядка, вычисленные для реакции гидроксиламина и О-метилгидроксиламина с аденозином.

Таблица 5.3. **Вычисленные значения констант скорости второго порядка для реакции аденозина с гидроксиламином и О-метилгидроксиламином**[163]

Реагент	k_2, л·моль$^{-1}$·ч$^{-1}$		
	при pH 4	при pH 5	при pH 6
Гидроксиламин	0,0010	0,0039	0,0032
О-Метилгидроксиламин	0,0010	0,0013	0,0005

Хотя точное значение оптимума pH не было определено, в обоих случаях он находится в области 4—5. Как и в случае цитидина, скорость реакции аденозина с гидроксиламином выше, чем с О-метилгидроксиламином. Единственными образующимися соединениями являются продукты замещения аминогруппы аденинового ядра на оксиамино- (LIIа) или О-метилоксиаминогруппу (LIIб); структура этих соединений была доказана их встречным синтезом из 6-метилмеркаптопуринрибозида.

LII

а (R = H)

б (R = CH_3)

В кислой области pH гидроксиламин проявляет определенную специфичность по отношению к вторичной структуре полинуклеотидов. Гидроксиламин не реагирует с нативной ДНК[164], но с денатурированной ДНК[164] и полицитидиловой кислотой[165, 166] реакция протекает, хотя и медленнее, чем с мономерами. Модификация гидроксиламином и О-метилгидроксиламином широко применяется в биологических исследованиях, в особенности генетического характера (обзоры — см.[167, 168]). Избирательность действия О-метил-

гидроксиламина по отношению к вторичной структуре нуклеиновых кислот недавно была использована для доказательства отличия вторичной структуры ДНК, упакованной внутри фаговой частицы, от двухспиральной ДНК, выделенной из этого же фага [169].

Действие гидразина и его производных

В щелочной среде гидразин расщепляет урацильные и цитозиновые производные (см. стр. 459); в кислой и нейтральной средах он реагирует лишь с цитозиновыми производными — с замещением аминогруппы [170]. В случае самого цитозина при реакции с 4 *М* раствором гидразина при pH 6 и 80° С были обнаружены два основных продукта замещения: 4-*экзо*-N-аминоцитозин LIII и N,N′-бис-[2-кето-1,2-дигидропиримидил-4-]-гидразин LIV.

Количество соединения LIV через 60 *ч* реакции достигает 43%, несмотря на то что в реакционной смеси присутствует большой избыток гидразина. В аналогичных условиях протекает реакция и с монометилгидразином, причем из двух возможных изомеров LV или LVI образуется только LVI, как это следует из данных по восстановлению продукта реакции цинком в соляной кислоте (при этом образуются аммиак и соединение, идентичное по УФ-спектру 4-*экзо*-N-метилцитозину [170]).

Замещение по аминогруппе наблюдалось также при взаимодействии цитозина с 1,2-диметилгидразином. Относительно образования цитозина при реакции продуктов типа LIV с моно- и 1,2-диметилгидразинами сведения отсутствуют. При действии на цитидин 5 *М* раствора гидразина при pH 8 и 21° С в присутствии кислорода воздуха и ионов меди [171] наблюдалось образование

4-*экзо*-N-аминоцитидина. В этих условиях также наблюдалось восстановление тимидина до 5,6-дигидротимидина и, по-видимому, восстановление 5-метилцитозина до 5,6-дигидропроизводного.

Пуриновые производные взаимодействуют с гидразином значительно медленнее, чем пиримидиновые; так, при обработке дезоксигуанозин- и дезоксиаденозин-5′-фосфатов при 60° С безводным гидразином после 4 *ч* реакции не удается обнаружить каких-либо продуктов взаимодействия. Интересно отметить, что при переходе к 2,4-динитрофенилгидразину специфичность действия по отношению к основаниям теряется [172], так что в этаноле, содержащем 1% HCl, экзоциклические аминогруппы всех аминонуклеозидов замещаются на динитрофенилгидразиновые остатки. В водных растворах эта реакция не исследовалась.

Реакция замещения аминогруппы в цитозине и его производных является, по-видимому, нуклеофильной реакцией, которая резко замедляется при протонировании гидразина. При pH 6 (в этих условиях исследовалась реакция гидразина с цитозином) всего 0,36% молекул реагента существует в непротонированной форме (значение pK_a гидразина равно 8,5) [148]. Это приводит к необходимости создания достаточно жестких условий для протекания реакции.

Значительный интерес в качестве модифицирующих агентов оснований представляют ацильные производные гидразина. Эти соединения обладают более низкими по сравнению с гидразином значениями pK_a, поэтому оптимум pH для реакций с их участием сдвинут в более кислую область. Для модификации гетероциклических оснований нуклеиновых кислот исследовано несколько типов ацильных производных гидразина: гидразид карбаминовой кислоты (семикарбазид) [165, 173–175], реактив Жирара [176, 177]

$$\left[C_5H_5\overset{+}{N}-CH_2CONHNH_2\right]Cl^-$$

ацетилгидразид [178] и ряд гидразидов многоосновных кислот (малоновой, 3,5-дисульфобензойной и 3,4-дикарбоксибензойной) [178]. Все эти соединения оказались реагентами, специфичными по отношению к цитозиновому ядру. Основная реакция, происходящая при таком взаимодействии, представляет собой замещение аминогруппы цитозина на ацилгидразидогруппу:

$$\text{Цитозин (4-}NH_2\text{, N1-R)} \xrightarrow{NH_2NHCOR'} \text{4-}NHNHCOR'\text{ (N1-R)}$$

LVII

а) $R' = NH_2$
б) $R' = CH_2-\overset{+}{N}C_5H_5$
в) $R' = CH_3$
г) $R' = CH_2COOH$

R — атом водорода или различные радикалы

Оптимальное значение pH для реакции с семикарбазидом и реактивом Жирара примерно 4,8; в случае гидразидов многоосновных кислот оптимум pH также лежит в интервале значений между 4 и 5 [178]. При значениях pH, отличающихся от оптимальных, скорость реакции значительно и резко уменьшается. В качестве примера на рис. 5.3 показана зависимость скорости реакции цитидина с семикарбазидом от pH среды.

Изучение кинетики реакции семикарбазида с цитидином и реактива Жирара с цитидин-5′-фосфатом показывает, что в обоих случаях зависимость скорости реакции от времени описывается уравнением первого порядка, если в смеси присутствует большой избыток гидразида. При этом реактив Жирара оказывается значительно менее реакционноспособным по сравнению с семикарбазидом. Так, при pH 4,2 и 37° С константа скорости реакции цитидина с семикарбазидом и цитидин-5′-фосфата с реактивом Жирара составляет 0,072 и 0,0144 *л · моль*$^{-1}$ · *ч*$^{-1}$ соответственно. В этих же условиях константа скорости реакции малонилгидразида (наиболее исследованного из ацилгидразинов многоосновных кислот) с дезоксицитидином составляет [178] около 0,05 *л · мин*$^{-1}$ · *ч*$^{-1}$. Гидразид 3,4-дикарбоксибензойной кислоты реагирует с дезоксицитидином примерно с такой же скоростью, однако он плохо растворим в воде, так что не удается достичь концентраций, необходимых для обеспечения высокой скорости модификации. Реакция дезоксицитидина с 3,5-дисульфобензоилгидразидом [179] идет медленнее, чем с семикарбазидом и реактивом Жирара, а также медленнее, чем с ацетилгидразидом, причем добавление в реакционную смесь ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, экранирующих отрицательный заряд сульфогрупп, еще больше замедляет скорость превращения. Реакцию дезоксицитидина с 3,5-дисульфобензоилгидразидом проводили при pH 4, поскольку при pH 4,5 скорость ее снижена примерно в 3 раза, а при pH 5,3 за 70 *ч* не удается обнаружить продукта реакции.

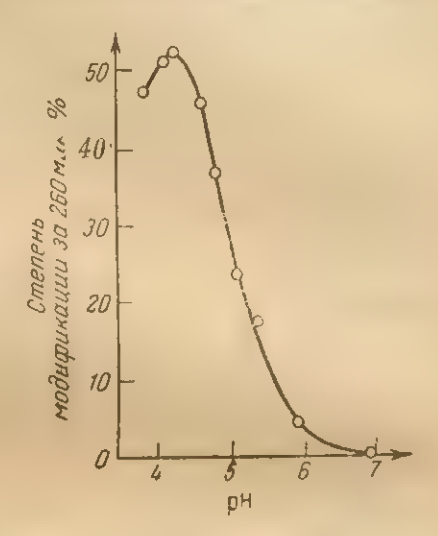


Рис. 5.3. Зависимость скорости реакции цитидина с 2*М* раствором семикарбазида от pH реакционной смеси при 37° С [173].

Исследовано также влияние температуры на скорость реакции производных цитозина с рядом ацилгидразинов. Первый порядок скорости реакции производных цитозина с ацилгидразидами и — по крайней мере в случае реакции с семикарбазидом — совпадение оптимума pH с теоретически вычисленным (см. стр. 209), возможно, свидетельствует о том, что данный тип реакций в основном

является прямым замещением аминогруппы цитозинового ядра на ацилгидразинную группу. Тем не менее не исключено, что, хотя бы частично, реакция протекает с первоначальным присоединением реагентов по двойной связи с последующим замещением лабильной аминогруппы образующегося дигидроцитозинового производного, как это протекает в случае реакции с гидроксиламинами (см. стр. 344). Действительно, при взаимодействии цитидина с семикарбазидом в реакционной смеси было обнаружено некоторое количество продукта, не имеющего максимума поглощения в области 250—300 *ммк* и легко превращающегося в основной продукт реакции в кислой области pH. Возможно, что это соединение является продуктом присоединения семикарбазида по двойной связи цитозинового ядра.

Наиболее важным преимуществом ацилгидразидных реагентов является то, что при модификации полинуклеотидов модифицируется только цитозиновое ядро и образуются те же продукты реакции, что и в случае мономеров *.

Действие семикарбазида и реактива Жирара на полинуклеотиды чувствительно ко вторичной структуре полимера. Так, в случае модификации под действием семикарбазида скорость реакции с цитозиновыми ядрами в денатурированной ДНК примерно равна скорости модификации этих звеньев в тРНК [174]. Скорость модификации нативной ДНК примерно в 25 раз ниже. Скорость реакции цитозиновых ядер в составе тРНК с семикарбазидом и реактивом Жирара также понижена по сравнению с цитидином. Значения константы скорости реакции тРНК с семикарбазидом [174] и реактивом Жирара [177] при pH 4,2, 37° С и концентрация реагентов 2 *M*, вычисленные по зависимости степени модификации тРНК от времени, равны соответственно 0,0294 и 0,0117 $ч^{-1}$. Таким образом, семикарбазид реагирует с тРНК примерно в 5, а реактив Жирара — в 2,5 раза медленнее, чем с цитидином. Медленнее, чем в случае нуклеозида, цитозиновое звено модифицируется и в составе полицитидиловой кислоты, как можно судить на примере реакции с семикарбазидом [165] и малонилгидразидом [178]. При участии цитозиновых звеньев полинуклеотида в образовании пар гуанин · цитозин модификация этих звеньев идет значительно медленнее, чем в том случае, когда цитозин находится на односпиральном участке полинуклеотида.

Углеводно-фосфатная цепь полинуклеотидов при модификации семикарбазидом [174] и реактивом Жирара [177] в заметной степени не разрушается. Однако вторичная структура полинуклеотидов после модификации этими агентами существенным образом изменяется (в случае реактива Жирара эффект выражен значительно силь-

* В случае модификации семикарбазидом тРНК получены данные [174], свидетельствующие о незначительной модификации аденинового ядра.

нее). Так, гиперхромия обработанной реактивом Жирара тРНК, содержащей 70% модифицированных звеньев, в температурном интервале 20—90° С составляет всего 8%, T_m этого препарата равна 46° С [177]. В то же время при 89%-ной модификации семикарбазидом [174] гиперхромия составляет 20%, T_m равна 46° С. Нативная тРНК показывает в этом интервале температур гиперхромию, равную 26%, и T_m 54° С. Различие в модификации полинуклеотидов этими двумя реагентами проявляется также во влиянии их на акцепторную активность тРНК; при модификации семикарбазидом акцепторная активность различных индивидуальных тРНК меняется в различной степени [175], при модификации же с помощью реактива Жирара различные тРНК уменьшают акцепторную активность примерно в одинаковой степени [177]. Такое различие в действии реагентов связано, возможно, с тем, что при модификации реактивом Жирара в полинуклеотид вводится значительное количество положительных зарядов.

Заканчивая рассмотрение основных нуклеофильных реагентов, используемых для модификации нуклеиновых кислот, сопоставим скорости их реакции с цитозиновым ядром, которое они все специфически модифицируют:

Реагент (условия реакции)	k_2, $л \cdot моль^{-1} \cdot ч^{-1}$
Семикарбазид (pH 4,2; 37° С)	0,072
Реактив Жирара (pH 4,2; 37° С)	0,0144
Малонилгидразид (pH 4,2; 37° С)	0,025
О-Метилгидроксиламин (pH 4,9; 30° С)	0,042
Гидроксиламин (pH 6; 30° С)	0,094

Наиболее реакционноспособными из рассмотренных соединений являются производные гидроксиламина, причем при оптимальных для каждого реагента значениях pH реакционная способность возрастает в ряду

реактив Жирара < малонилгидразид < семикарбазид ⩽

⩽ О-метилгидроксиламин < гидроксиламин

Прочие реакции замещения аминогрупп

Помимо рассмотренных выше реакций замещения аминогрупп оснований (в составе нуклеозидов и нуклеотидов) следует отметить дезаминирование под действием щелочи и переаминирование. Эти реакции протекают при более жестких условиях, однако представляют определенный интерес. Щелочной гидролиз нуклеиновых кислот является одним из наиболее распространенных методов их анализа, и данные по дезаминированию оснований в условиях гидролиза необходимы для правильной оценки нуклеотидного состава. При условиях гидролиза (обычно действие 0,3 н. щелочи, 37° С,

24 *ч*) дезаминируется только ядро цитозина [179–182], причем степень дезаминирования высока и составляет 10—12%.

R= H или OH

В этих условиях, кроме того, наблюдается заметное расщепление цитозинового и урацильного циклов. В более жестких условиях [183–184] (100° С, 1 н. KOH или NaOH), хотя по-прежнему с наибольшей скоростью модифицируется ядро цитозина, наблюдается также заметное дезаминирование производных аденина [184]. Следует отметить, что 5-метилдезоксицитидин дезаминируется медленнее, чем цитидин и дезоксицитидин [184]; причины этого явления пока не ясны.

Переаминирование представляет собой возможный метод синтеза замещенных по аминогруппе аналогов оснований LVIII.

LVIII

R= H или OH

R'—алкильный радикал

Переаминирование производных цитозина протекает в водных растворах при реакции с ароматическими аминами [88]; оно сопровождается одновременным дезаминированием. Из исследованных аминов наибольшая скорость переаминирования при pH 4 и 95° С наблюдалась в случае *о*-аминофенола. Менее быстро реагируют анилин и β-нафтиламин. Значительно медленнее протекает реакция с α-нафтиламином и 9-аминоакридином. В последних двух случаях определенную роль в эффекте замедления реакции играют, вероят-

но, пространственные эффекты. Известны также и другие реакции переаминирования производных цитозина, которые проводились в еще более жестких условиях [185, 186].

Обсуждение вопроса о реакциях замещения аминогруппы в цитозиновом ядре было бы неполным без рассмотрения реакций производных 5,6-дигидроцитозина. Многие реакции цитидина, и в частности рассмотренная выше реакция с гидроксиламинами, протекают через промежуточное образование дигидропроизводных. Кроме того, при фотохимических превращениях нуклеиновых кислот (гл. 12) одной из важнейших реакций является замещение аминогруппы в ядре 6-окси-5,6-дигидроцитозина и в пиримидиновых димерах, в состав которых входит цитозиновое ядро.

Лабильность аминогруппы в производных дигидроцитозина хорошо известна. В частности, как уже отмечалось, при восстановлении цитидина и его фосфатов зачастую получаются соответствующие производные дигидроурацила вследствие дезаминирования образующегося дигидроцитозина в процессе восстановления (см. стр. 338). Однако наиболее подробно изучено дезаминирование дигидроцитозинового ядра в составе 6-окси-5,6-дигидроцитидин-3′-фосфата LIX [187–189] и фотодимера цитидилилцитидина CpC [188] (подробнее — см. гл. 12). В первом случае наблюдаются две параллельные реакции: дезаминирование с образованием 6-окси-5,6-дигидроуридин-3′-фосфата LX и дегидратация до цитидин-3′-фосфата [187].

Реакция отщепления элементов воды с превращением в цитидинмонофосфат с максимальной скоростью протекает при pH 5, скорость превращения LIX в LX монотонно возрастает вплоть до pH 3. Обе реакции подчиняются закономерностям реакций первого порядка, и константы скорости реакций дегидратации и дезаминирования при pH 5 и 25° C равны соответственно $1{,}6 \cdot 10^{-2}$ и $4 \cdot 10^{-4}$ *мин*$^{-1}$. При других значениях pH и температуры скорость дегидратации по-прежнему значительно выше скорости дезаминирования. Скорость замещения аминогруппы резко возрастает в присутствии различных нуклеофильных реагентов. Так, гидриро-

вание цитидина в присутствии глицина [190] при pH 9,8 и 7,8 приводит к количественному выходу 4-*экзо*-N-карбоксиметил-5,6-дигидроцитидина LXI.

NH_2 —H_2→ NH_2 —NH_2CH_2COOH→ $NHCH_2COOH$

LXI

R — остаток рибозы

При pH 6,6 эта реакция протекает лишь в незначительной степени, а при pH 5 практически не идет [190], что обусловлено, по-видимому, потерей глицином нуклеофильных свойств при протонировании аминогруппы в этом интервале значений pH. Аналогичное замещение аминогруппы наблюдается при гидрировании цитидина в присутствии ряда других аминов [190].

Сходным образом в присутствии таких сильных нуклеофильных агентов, как гидроксиламин или O-метилгидроксиламин, фотогидрат цитидина (6-окси-5,6-дигидроцитидин) практически количественно превращается в 4-*экзо*-N,6-диокси-5,6-дигидроцитидин LXII (R′ = H) или 4-*экзо*-N-метокси-6-окси-5,6-дигидроцитидин LXII (R′ = CH_3) [191]:

NH_2 —H_2NOR'→ NHOR′

LXII

R — остаток рибозы

R′ = H или CH_3

Скорость реакции замещения аминогруппы в данном случае значительно выше скорости дегидратации. Замещение аминогруппы с помощью гидроксиламина и O-метилгидроксиламина для производных дигидроцитозина протекает со скоростью, значительно более высокой, чем модификация цитозинового ядра теми же реагентами. Так, при 0° С в присутствии 0,25 *М* раствора гидроксиламина (pH 6,5) или O-метилгидроксиламина (pH 5,5) фотогидрат цитидина превращается в соединения LXII (R′ = H или CH_3) за 3 или 4 *ч* соответственно, тогда как цитидин за это же время и в этих же условиях модифицируется гидроксиламином всего на 2%,

а О-метилгидроксиламином на 0,3%[191]. Отсюда вытекает, в частности, что при реакции гидроксиламинов с цитидином (см. стр. 344) промежуточный продукт присоединения по двойной связи XLIX должен присутствовать в реакционной смеси лишь в малых концентрациях, подвергаясь быстрому замещению аминогруппы.

Легкое дезаминирование наблюдается также в случае таких производных дигидроцитозина, как образующиеся при облучении цитидилил-(3′→5′)-цитидина димеры[188]. Если предположить, что образуются димеры циклобутанового типа LXIII (см., однако, стр. 670), то дезаминирование может быть, по-видимому, представлено следующим образом:

LXIII

LXIVа LXIVб LXV

R–p–R′ — остаток рибозил-(3′→5′)-рибозы

При этом димеры LXIII, содержащие два цитозиновых ядра, претерпевают последовательное дезаминирование, превращаясь сначала в смесь димеров LXIVа и LXIVб, содержащих одно цитозиновое и одно урацильное ядро, и затем в димеры LXV, содержащие два урацильных ядра. Полное превращение димеров LXIII в димеры LXV происходит за сутки при комнатной температуре *.

Возможно, что легкое замещение аминогруппы в производных дигидроцитозина является причиной образования ковалентных связей белков с нуклеиновыми кислотами при облучении нуклеопротеидов[192] и при действии на них О-метилгидроксиламина[169]. В первом

* При облучении образуются два изомерных димера типа LXIII, структурные отличия между которыми пока не установлены; соответственно при дезаминировании должны образовываться по два изомера каждого из соединений LXIVа, LXIVб и LXV, которые, однако, не изолированы.

случае нуклеофильные группы белковой молекулы (например, амино- или меркаптогруппы) могут замещать аминогруппу в фотогидрате цитозина или в димерах, содержащих цитозиновое ядро. Во втором случае аналогичное замещение может происходить в промежуточно образующемся 6-метоксиамино-5,6-дигидроцитозиновом ядре XLIX ($R'=CH_3$). Возможно, что дигидроцитозиновые производные образуются также в качестве промежуточных соединений при дезаминировании производных цитозина, как это, например, предполагается в случае дезаминирования в присутствии кислых буферов[88].

Реакции замещения аминогруппы в нуклеозидах и нуклеотидах, и особенно в случае производных цитозина, под действием сильных нуклеофильных агентов протекают, как было показано, в довольно мягких условиях и вследствие этого широко применяются для модификации нуклеиновых кислот. Замена карбонильной группы требует существенно более жестких условий, и подобные замещения в нуклеозидах (например, на атом хлора[193, 194] или на серу[195, 196]) достаточно хорошо известны и широко применяются при синтезе аналогов нуклеозидов и нуклеотидов. Однако в данной книге такие превращения не рассматриваются, поскольку необходимые для них жесткие условия неприменимы для полинуклеотидов.

III. РЕАКЦИИ ЗАМЕЩЕНИЯ И ПРИСОЕДИНЕНИЯ ПО АТОМАМ АЗОТА

Как уже указывалось ранее (см. гл. 3), гетероциклические основания, входящие в состав нуклеозидов и нуклеотидов, содержат атомы азота двух типов. Атомы азота, обладающие двумя заместителями, отдают в сопряженную систему один π-электрон и имеют некоторый избыток электронной плотности. По своей химической характеристике они аналогичны атому азота в пиридине. Примером таких атомов азота могут служить N-3 и N-7 в пуринах, N-1 в аминоформе аденозина и N-3 в аминоформе цитидина. Эти атомы могут легко подвергаться атаке под действием электрофильных реагентов, в частности протона. Направление протонирования обычных нуклеозидов и нуклеотидов также уже обсуждалось в гл. 3. Как будет видно из материала, рассматриваемого в данном разделе, ориентация замещения под действием многих электрофильных агентов аналогична ориентации протонирования.

Атомы азота, обладающие тремя заместителями, отдают в сопряженную систему два π-электрона и несут частичный положительный заряд. По своей химической характеристике они аналогичны атому азота в пирроле или в циклических имидах. В тех случаях, когда одним из заместителей является атом водорода (например, N-1 в кетоформе гуанозина или N-3 в кетоформе уридина), последний за счет поляризации связи N—H может относи-

тельно легко отщепиться в виде протона, т. е. соединение обладает свойствами кислоты. В образующемся после диссоциации анионе рассматриваемые атомы азота уже обладают избытком электронной плотности и могут подвергаться атаке под действием как протона, так и других электрофильных реагентов.

Наиболее характерные реакции замещения у атомов азота гетероциклического ядра протекают, таким образом, под действием электрофильных реагентов. К их числу относятся прежде всего реакции алкилирования нуклеозидов и нуклеотидов. При этом атомы азота гетероциклических ядер могут выступать в качестве нуклеофильных агентов в реакциях замещения у насыщенного атома углерода в алкилгалогенидах или алкилсульфатах, реакциях раскрытия кольца α-окисей и эпиминов, реакциях присоединения по поляризованной связи $C=C$ (например, цианэтилирование компонентов нуклеиновых кислот под действием акрилонитрила), связи $C=N$ (например, взаимодействие с карбодиимидами) или связи $C=O$ (например, ацилирование). Весьма характерной реакцией замещения у атомов азота гетероциклического ядра является также образование N-окисей под действием перкислот; эта реакция, вероятно, также протекает по механизму электрофильного замещения у атомов азота.

1. Взаимодействие с алкилирующими агентами

Изучение действия алкилирующих агентов на нуклеиновые кислоты привлекает большое внимание; литература, посвященная этому вопросу, весьма обильна (обзоры — см. [197–199]) и часто противоречива. Многие алкилирующие агенты являются эффективными мутагенами и канцерогенами; с другой стороны, целый ряд химиотерапевтических веществ, используемых как противораковые агенты, также относятся к данному классу соединений. В свете этого выяснение химических превращений, которые претерпевают нуклеиновые кислоты под действием алкилирующих агентов, имеет фундаментальное значение для понимания процессов, происходящих в нормальных и опухолевых клетках.

Метилирование диазометаном

Как известно, атом углерода в диазометане обладает нуклеофильным характером, и это соединение легко взаимодействует с органическими кислотами (донорами протона) по следующему механизму:

$$AH + \bar{C}H_2-\overset{+}{N}\equiv N \longrightarrow A^- + CH_3-\overset{+}{N}\equiv N \longrightarrow \overset{+}{C}H_3 + N_2$$

В тех случаях, когда подвергающееся метилированию соединение имеет несколько реакционноспособных центров, направление

реакции зависит от экспериментальных условий. В условиях, когда метилируемое соединение является единственным донором протона в среде, действие диазометана должно приводить к замещению на метильную группу атома водорода, обладающего наиболее кислыми свойствами; в случае гетероциклических оснований нуклеиновых кислот это приводит к замещению у атома азота, связанного с водородом и обладающего наименьшей электронной плотностью. Если в реакционной смеси имеются и другие доноры протона, то атака образующегося метильного катиона может проходить по наиболее нуклеофильному центру молекулы, т. е. по атому азота с наибольшей электронной плотностью, причем это направление реакции может стать преобладающим.

Экспериментальные данные по метилированию нуклеозидов диазометаном подтверждают указанные соображения. Метилирование производных уридина диазометаном было впервые описано в 1934 г. при доказательстве структуры этого нуклеозида [200]. В дальнейшем неоднократно сообщалось о метилировании диазометаном уридина и его производных в различных условиях [6, 201–205]; во всех случаях продуктом реакции являются производные 3-N-метилуридина LXVI. Аналогично протекает и метилирование тимидина [201, 204, 206, 207].

$$\xrightarrow{CH_2N_2}$$

R — остаток рибозы

В качестве побочной реакции наблюдалось лишь метилирование по сахару (см. гл. 9) с образованием 3-N,2′-O-диметилуридина [208].

В молекуле цитидина наиболее кислыми свойствами обладает гидроксильная группа остатка рибозы при С-2′; в соответствии с этим при метилировании диазометаном в 1,2-диметоксиэтане происходит алкилирование остатка сахара [209] (подробнее см. гл. 9). Напротив, при обработке водного раствора цитидина эфирным раствором диазометана наблюдается метилирование по ядру с образованием 3-N-метилцитидина LXVII [204]:

$$\xrightarrow{CH_2N_2}$$

LXVII

R — остаток рибозы

Аналогичная картина наблюдается и при метилировании аденозина: действие диазометана в 1,2-диметоксиэтане приводит к продуктам замещения в остатке сахара [209–212]; проведение же реакции в водно-эфирной эмульсии — к образованию с низким выходом 1-N-метиладенозина LXVIII [204]. Соответствующий продукт получен и из 2′-дезоксиаденозина [206, 207].

CH_2N_2

LXVIII

R — остаток рибозы или дезоксирибозы

Направление реакции при метилировании гуанозина также зависит от условий. При обработке диазометаном суспензии гуанозина в эфире наблюдается образование 1-N-метилгуанозина LXIX [213]; при реакции же в водно-эфирной среде был получен 7-N-метилгуанозин LXX [204, 214, 215]:

LXIX LXX

R — остаток рибозы

Соединение LXX было получено впервые взаимодействием диазометана с 2′,3′,5′-три-O-ацетилгуанозином в спиртовой среде [216]; первоначально, однако, ему была неправильно приписана структура 1-метилгуанозина. Метилирование дезоксигуанозина в водной среде протекает аналогичным образом [207, 214]; при реакции в смеси эфира и метанола обнаружены [206] продукты замещения по N-1, N-7 и 6-*экзо*-O.

Способность рибонуклеозидов вступать в реакцию с диазометаном в водно-эфирной среде убывает в ряду [204]: гуанозин ≈ уридин ≫ цитидин > аденозин. Аналогичный ряд наблюдается и для четырех дезоксинуклеозидов (тимидин вместо уридина), однако в этом случае дезоксигуанозин реагирует намного быстрее, чем тимидин [207].

Метилированные нуклеозиды заметно отличаются по свойствам от неметилированных соединений. Для 7-N-метилдезоксигуанозина характерна крайняя легкость расщепления N-гликозидной связи (см. гл. 8), эта реакция протекает уже в нейтральной среде. В щелочной среде 7-N-метилгуанозин и его производные претерпевают расщепление имидазольного кольца (см. стр. 437). 1-N-Метиладенозин и его производные в щелочной среде перегруппировываются в 6-*экзо*-N-метилпроизводные (см. стр. 450), 3-метилцитидин в этих условиях легко дезаминируется до 3-метилуридина, который далее расщепляется с раскрытием гетероцикла (см. стр. 455).

Диазометан взаимодействует и с редкими компонентами РНК; наиболее подробно изучена его реакция с инозином [215–218]. При метилировании 2′,3′,5′-три-O-ацетилинозина в спирто-эфирной среде главным продуктом реакции является 1-N-метилинозин LXXI [216]; наряду с ним образуются значительные количества 7-N-метилинозина LXXII [215] и 6-метокси-9-(β-*D*-рибофуранозил)-пурина LXXIII [217]:

LXXI

LXXII LXXIII LXXIV

R — остаток рибозы

Аналогичные производные были получены при метилировании 2′,3′-O-изопропилиденинозина в смеси спирт-диоксан. Однако при реакции с инозином в водном растворе при pH 7 за счет расщепления имидазольного цикла в 7-N-метилинозине и последующего метилирования образуется также значительное количество 5-(формилметиламино)-6-(*D*-рибофуранозиламино)-дигидропиримидона-4 LXXIV [218].

Метилирование псевдоуридина приводит к образованию 1,3-ди-N-метильного производного [219]. При действии на 4-тиоуридин диа-

зометана протекает в основном замещение у атома серы (см. стр. 428).

При переходе от нуклеозидов к нуклеотидам возникает новая побочная реакция — алкилирование по атому кислорода остатка фосфорной кислоты. Реакцию проводят обычно в водных растворах при pH ~ 7. При этом протонирован лишь один из атомов кислорода, и основным продуктом реакции являются фосфодиэфиры[204]; фосфотриэфиры образуются лишь в незначительных количествах.

$$RO{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle O^-}{|}}{P}}{-}OH + CH_2N_2 \longrightarrow RO{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle O^-}{|}}{P}}{-}OCH_3 + N_2$$

R — различные органические радикалы

Метилирование по остатку фосфорной кислоты является преобладающей реакцией в случае аденозин-5′-фосфата и цитидин-5-′фосфата. При метилировании уридин-5′-фосфата получается[204] смесь 3-N-метилуридин-5′-фосфата и уридин-5′-метилфосфата в соотношении 3 : 2. Близкая картина наблюдается и для гуанозин-5′-фосфата.

О возможности избирательного метилирования гетероциклических оснований в олигонуклеотидах под действием диазометана в литературе имеются противоречивые сведения. Кембриджская группа исследователей при обработке диазометаном ApU, UpA и GpU получила с высоким выходом аденилил-(3′→5′)-3-N-метилуридин[207, 220], 3-метилуридилил-(3′→5′)-аденозин[220] и 7-метилгуанилил-(3′→5′)-уридин[221]. С другой стороны, по данным Голы и Шайта[222], при метилировании ряда олигорибонуклеотидов диазометаном происходит сильное расщепление фосфодиэфирной связи и метилирование по 2′-гидроксильной группе остатка рибозы; при метилировании тимидилил-(3′→5′)-тимидина отмечено образование заметных количеств триэфира. В случае ApU авторы последней работы наблюдали метилирование как по остатку урацила, так и по остатку аденина.

При метилировании диазометаном полинуклеотидов всегда наблюдается некоторая деградация полинуклеотидной цепи. Так, по данным английских исследователей, при метилировании полиуридиловой кислоты можно добиться 78%-ного превращения уридиловых звеньев в 3-N-метилуридиновые, однако при этом происходит заметное уменьшение константы седиментации полимера[207]. При метилировании РНК[223] и ДНК[224] основным направлением реакции является замещение по остатку гуанина. При проведении реакции с РНК в водно-эфирной среде с последующим кислотным гидролизом в качестве главных метилированных продуктов были

идентифицированы 7-N-метилгуанин (65% от суммы метилированных оснований) и 1-N-метиладенин (27%); в меньших количествах (8%) найдены 3-N-метилцитозин и продукты дальнейшего превращения 7-N-метилгуанина — 1,7-диметилгуанин LXXV, 2,6-диамино-5-метиламинодигидропиримидинон-4 LXXVI (R = H) и его 3-N-метильное производное LXXVI (R = CH_3); 3-N-метиладенин не обнаружен.

LXXV LXXVI LXXVII

Метилирование в аналогичных условиях ДНК из молок лосося с последующим кислотным гидролизом приводит к получению 7-N-метилгуанина (81%) и 3-N-метиладенина LXXVII (19%). 1-N-Метиладенина и 3-N-метилцитозина обнаружено не было. Необычное направление метилирования остатка аденина связано, очевидно, с относительной пространственной недоступностью атома N-1 аденина при двухспиральной структуре полимера.

При обработке диазометаном суспензии РНК в эфире с последующим кислотным гидролизом в качестве метилированных продуктов были выделены 3-N-метилурацил (в основном) и 1-N-метилгуанин[223] (в меньшем количестве). Побочной реакцией при метилировании РНК и ДНК является расщепление полинуклеотидной цепи, которое в случае РНК происходит, по-видимому, за счет распада фосфотриэфиров (продуктов метилирования по фосфатной группе), а в случае ДНК — в основном за счет легкого отщепления 7-N-метилгуанина и 3-N-метиладенина и последующей β-элиминации (см. гл. 8 и 10). Таким образом, метилирование диазометаном, по-видимому, непригодно для препаративного получения метилированных полинуклеотидов, но может быть с успехом применено при синтезе метилированных нуклеозидов и нуклеотидов.

Диазоэтан действует аналогично диазометану, хотя степень алкилирования РНК и ДНК под действием этого реагента заметно ниже[223, 224]. В случае ДНК обработкой при pH 6,8 не удается добиться этилирования; реакцию можно провести при pH 8,0; соотношение 7-N-этилгуанин : 3-N-этиладенин в продуктах кислотного гидролиза равно 3 : 1[223].

С промежуточным образованием диазометана или метильных катионов связано, по-видимому, эффективное канцерогенное, канце-

ростатическое и мутагенное действие ряда N-метил-N-нитрозосоединений LXXVIII, которые, как известно, при действии щелочи дают диазометан:

$$\underset{\text{LXXVIII}}{R{-}N\langle^{CH_3}_{NO}} + OH^- \longrightarrow ROH + [CH_3{-}N{=}N{-}O^-] \xrightarrow[-OH^-]{} \bar{C}H_2{-}\overset{+}{N}{\equiv}N$$

Наиболее часто используются для исследований следующие соединения этого класса:

N-нитрозодиалкиламины ($R=CH_3$, C_2H_5);

N-метил-N-нитрозомочевина ($R = CONH_2$);

N-метил-N-нитрозоуретан ($R = COOC_2H_5$);

N-метил-N-нитрозо-*п*-толуолсульфамид ($R = п\text{-}CH_3C_6H_4SO_2$);

N-метил-N-нитрозо-N′-нитрогуанидин [$R=C(=NH)NHNO_2$].

Показано, что биологическое действие этих соединений связано в значительной степени с их взаимодействием с ДНК [225-231] или РНК [232, 233]. Основным направлением реакции в случае N-нитрозодиалкиламинов [225], N-метил-N-нитрозо-*п*-толуолсульфамида [234, 352-354] и N-метил-N-нитрозо-N′-нитрогуанидина [234-237] является алкилирование по N-7 остатков гуанина. Для последних двух реагентов скорость реакции возрастает с увеличением pH среды [234], что соответствует предположению о промежуточном образовании диазометана или метильных катионов *.

Алкилирование не является, однако, единственной реакцией, происходящей при действии рассматриваемых нитрозосоединений на нуклеиновые кислоты. Другой протекающий при этом процесс [236] — дезаминирование оснований, содержащих аминогруппу (см. гл. 6).

Этилирование нуклеозидов под действием борфторида триэтилоксония [348], возможно, протекает через промежуточное образование алкильных радикалов. Эта реакция в отличие от большинства реакций алкилирования может быть выполнена в водном растворе. При обработке борфторидом триэтилоксония (pH 9) смеси аденозина, гуанозина, цитидина и уридина алкилированию подвергается только уридин.

Действие алкилгалогенидов и эфиров серной и сульфоновых кислот

Алкилгалогениды и эфиры серной и сульфоновых кислот часто используются для алкилирования нуклеиновых кислот и их компонентов. Наиболее подробно изучена реакция метилирования; обычными реагентами для метилирования нуклеозидов и нуклеотидов являются иодистый метил и диметилсульфат: реакцию с нуклеозидами обычно проводят в биполярных апротонных растворителях,

* О продуктах реакции нуклеозидов с N-метил-N-нитрозомочевиной — см. [355].

а с нуклеотидами — в водных растворах. Для метилирования полинуклеотидов чаще всего используют диметилсульфат или метилметансульфонат как алкилирующий агент и воду в качестве растворителя.

Взаимодействие этих алкилирующих агентов с гетероциклическими основаниями нуклеиновых кислот протекает, по-видимому, как бимолекулярное нуклеофильное замещение у насыщенного атома углерода:

$$CH_3X + :B \longrightarrow CH_3{-}B^+ + X^-$$

В — гетероциклическое основание

Естественно, что алкилирование гетероциклического основания (и его производных) протекает при этом по месту наибольшей электронной плотности. Наиболее легко из обычных нуклеозидов подвергаются алкилированию производные гуанозина. Метилирование гуанозина и 2′-дезоксигуанозина иодистым метилом в диметилформамиде[215] или диметилсульфатом в водном растворе при pH 4[215, 238] приводит к 7-N-метилгуанозину* или 7-N-метил-2′-дезоксигуанозину. Обработка иодистым метилом в диметилсульфоксиде в присутствии поташа дает 1-N-метилпроизводные[239], при дальнейшем метилировании 1-N-метилгуанозина образуется 1,7-диметилгуанозин.

R — остаток рибозы и дезоксирибозы

Довольно легко подвергаются метилированию под действием рассматриваемых алкилирующих агентов и производные аденозина. Основным продуктом реакции при этом является 1-N-метиладенозин[215, 238, 241–243] или его производные; в качестве побочных продуктов идентифицированы 1-N,6-*экзо*-N-диметиладенозин[238, 239] и 3,7-N,N-диметиладенин[239]. Отмечалось также образование нуклеозидов, которые после расщепления N-гликозидной связи дают 3-N-метиладенин[243, 244] и 7-N-метиладенин[245], однако сами соответствующие нуклеозиды выделены не были. Степень метилирования остатка аденина по N-3 и N-7 невелика: после метилирования дезоксиаденозин-5′-фосфата диметилсульфатом в водном растворе при pH 7 выходы нуклеотидов, превращающихся после кислотного

* В первоначальной работе[238] продукту реакции было неверно приписано строение 1-N-метилгуанозина на основании идентичности с продуктом, полученным метилированием диазометаном (см. стр. 361).

гидролиза в 1-N-метиладенин, 3-N-метиладенин и 7-N-метиладенин, составили соответственно 26; 1,2 и 2,3% [245].

Единственным продуктом, образующимся при метилировании цитидина диметилсульфатом, является 3-N-метилцитидин [246]. Уридин и тимидин в обычных условиях метилирования в реакцию не вступают *; образование производных 3-N-метилуридина и 3-N-метилтимидина отмечалось лишь в жестких условиях, применяемых для метилирования гидроксильных групп углеводов [249, 250].

Таким образом, легкость метилирования обычных нуклеозидов данными алкилирующими агентами убывает в ряду

гуанозин > аденозин > цитидин ≫ уридин

Как и в случае метилирования диазометаном, из редких компонентов нуклеиновых кислот лучше всего изучено метилирование инозина. При действии иодистого метила в диметилсульфоксиде единственным продуктом реакции является 7-N-метилинозин LXXII, а при действии метил-*n*-толилсульфоната в присутствии поташа — 1-N-метилинозин LXXI [215]. Обработка 2′,3′-O-изопропилиденинозина десятикратным избытком диметилсульфата в водном диоксане приводит к 3-N-метил-5-(формилметиламино)-6-(2′,3′-O-изопропилиденрибофуранозиламино)-дигидропиримидону-4 (LXXIX) [218], который образуется, по-видимому, за счет расщепления промежуточно возникающего 1,7-диметилинозина LXXX**

LXXIX LXXX

R — остаток замещенной рибозы

При метилировании данными агентами нуклеотидов может происходить побочная реакция алкилирования по кислороду фосфатной группы. Поскольку нуклеофильность дианиона фосфомоноэфи-

* Микельсон и др. [247] недавно сообщили о количественном метилировании полиуридиловой кислоты до поли-(3-N-метилуридиловой) кислоты под действием диметилсульфата в присутствии три-*н*-бутиламина. Эти условия реакции не проверены пока на мономерах. Метилирование остатков уридина в полиуридиловой кислоте было достигнуто также при действии метилметансульфоната [248] в водном растворе при pH 7.

** Аналогичное строение имеет, по-видимому, соединение, образующееся при метилировании 1-N- или 7-N-метилинозинов действием диметилсульфата в присутствии три-*н*-бутиламина; ему приписывается строение 1,7-диметилинозина [251].

ра значительно выше, чем для моноаниона фосфомоноэфира (или фосфодиэфира), предпочтительно проводить алкилирование нуклеозид-5′-фосфатов при pH около 4, когда эти соединения находятся в виде моноаниона. В этих условиях удалось добиться гладкого превращения аденозин-5′-фосфата в 1-N-метиладенозин-5′-фосфат[252]. Побочные реакции образования фосфоэфиров подавляются еще сильнее при метилировании двузамещенных пирофосфатов, например P[1]-(аденозин-5′)-P[2]-бензилпирофосфата[252] или аденозиндифосфатглюкозы[253]. Аналогичным путем цитидин-5′-фосфат удается превратить в 3-N-метилцитидин-5′-фосфат[154]. Оказалось, что даже при высоких значениях pH степень метилирования по фосфатной группе под действием рассматриваемых алкилирующих агентов невелика. Так, при обработке гуанозин-5′-фосфата иодистым метилом в диметилсульфоксиде в присутствии гидроокиси тетрабутиламмония был получен с хорошим выходом 1-N-метилгуанозин-5′-фосфат[240]; в близких условиях осуществлено превращение инозин-5′-дифосфата в 1-N-метилинозин-5′-дифосфат[240].

При метилировании олигонуклеотидов диметилсульфатом побочные реакции незначительны[204], и таким путем, например, удается гладко провести метилирование остатка аденозина в аденилил-(3′—5′)-уридине[207] или остатка инозина в уридилил-(3′—5′)-инозине[218]. Сообщалось об успешном метилировании полиадениловой[207, 248, 254, 255], полицитидиловой[207, 247, 248], полигуаниловой[251] и даже полиуридиловой[247, 248] кислот; наиболее удобные условия реакции здесь, по-видимому, действие диметилсульфата в водной среде в присутствии три-*н*-бутиламина[247]. В этих условиях полиинозиновая кислота дает продукт реакции, которому было приписано строение поли-(1,7-диметилинозиновой) кислоты[251] (ср. подстрочное примечание на стр. 367); при действии же иодистого метила в водном диметилсульфоксиде образуется поли-(7-метилинозиновая) кислота.

В природных полинуклеотидах реакционная способность различных гетероциклических оснований по отношению к данным алкилирующим агентам заметно различна. Как видно из данных табл. 5.4, метилирование суммарной РНК под действием метилметансульфоната протекает в основном по N-7 остатков гуанозина, в меньшей степени наблюдается реакция по N-1 остатков аденозина и по N-3 остатков цитидина[256] (см. также[353]). Близкие результаты, хотя и при значительно меньшей степени алкилирования, получены при метилировании тРНК диметилсульфатом в диметилформамиде[257, 356, 357]. Можно добиться и специфической модификации остатка гуанозина; например, при метилировании тРНК диметилсульфатом в водной среде при pH 5,0 достигается 50%-ное метилирование по остаткам гуанозина без затрагивания других нуклеозидов[247]. При алкилировании фенилаланиновой тРНК из дрожжей

действием диметилсульфата удалось подобрать условия, в которых метилируются лишь пять остатков гуанозина в молекуле полинуклеотида [358].

Таблица 5.4. **Метилирование РНК и ДНК под действием метилметансульфоната** [256]

Продукты реакции после кислотного гидролиза (водная среда, pH 7,2; 37° С)

Исходный полинуклеотид	Состав оснований *, %			
	7-N-метиладенин	1-N-метиладенин	3-N-метиладенин	3-N-метилцитозин
Суммарная РНК из дрожжей ** . .	64	23	—	12
Суммарная РНК из печени крыс . .	71	16	1	12
Нативная ДНК из спермы лосося	86	5	9	—
Та же ДНК, но денатурированная	63	31	6	—

* От суммы метилированных оснований.

** Помимо указанных метилированных оснований обнаружены также 3-N-метилурацил (0,5%) и 6-*экзо*-N-метиладенин (1%).

Еще большая избирательность реакции наблюдается в случае ДНК, особенно при использовании нативного двухцепочечного комплекса. При этом реакционная способность остатка дезоксиаденозина существенно изменяется и метилирование происходит главным образом по N-3 [256]; это связано, очевидно, со стерическими ограничениями, налагаемыми вторичной структурой. Удается добиться 80%-ной модификации остатков дезоксигуанозина без затрагивания других нуклеозидов [247].

Модификация полинуклеотидов диметилсульфатом может быть применена для исследования первичной структуры. Специфическое метилирование по остатку дезоксигуанозина в ДНК и последующее выдерживание в нейтральной среде приводит к отщеплению 7-метилгуанина; образующаяся «дегуаниловая ДНК» может быть расщеплена на блоки с помощью β-элиминации [247] (см. гл. 1 и 10). В случае РНК метилирование можно использовать для повышения специфичности ферментативного расщепления, так как 3′-фосфодиэфирная связь, образуемая остатком 3-N-метилцитидина, не расщепляется под действием панкреатической пиримидил-РНК-азы, а 3′-фосфодиэфирная связь, образуемая остатком 7-N-метилгуанозина, — под действием гуанил-РНК-азы T_1. Последний принцип был использован при установлении структуры 5S РНК (см. гл. 1).

Вторичная структура ДНК сильно влияет на протекание реакции метилирования под действием алкилирующих агентов (см.

табл. 5.4); в образующемся продукте двухспиральная структура сохраняется, хотя T_m такой модифицированной ДНК заметно снижается по сравнению с исходной ДНК [247]. Защита остатков аденина и цитозина от действия метилирующих агентов наблюдается и в случае комплексов полирибонуклеотидов [247]. Так, двухцепочечный комплекс (поли-A)·(поли-U) устойчив к действию диметилсульфата, а комплекс (поли-G)·(поли-C) метилируется этим агентом только по остаткам гуанозина. Менее устойчивый комплекс (поли-I)·(поли-C) полностью разрушается и метилируется в этих условиях. Вторичная структура одноцепочечных полинуклеотидов, стабилизированная за счет межплоскостных взаимодействий оснований (например, в случае полиадениловой кислоты), сильно изменяется после метилирования метилметансульфонатом [258]. Возможно, что функция метилированных нуклеозидов — редких компонентов РНК (см. гл. 1) — и состоит в определенном изменении вторичной структуры полимера, необходимом для его биологического функционирования.

Ряд исследований был посвящен изучению влияния метилирования на биологические свойства полинуклеотидов: наблюдалось изменение способности синтетических полирибонуклеотидов направлять синтез полипептидов [254], инактивация тРНК [257], мутагенный эффект при действии на ДНК или РНК вирусов. В случае ДНК биологическое действие связано, по-видимому, с отщеплением 7-N-метилгуанина (см. гл. 8).

Алкилирование нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов под действием других алкилирующих агентов рассматриваемого типа изучено гораздо слабее. При действии диэтилсульфата на гуанозин наблюдается алкилирование по N-7 [259]. Продукты, получаемые при реакции этилметансульфоната с ДНК, аналогичны продуктам, образующимся с метилметансульфонатом, но реакция протекает медленнее [256]. При взаимодействии гуанозина, аденозина и цитидина с бромистым бензилом в диметилацетамиде при 37°C были получены 7-N-бензилгуанозин, 1-N-бензиладенозин и 3-N-бензилцитидин [260]; в более жестких условиях (действие бензилбромида в диметилформамиде или диметилсульфоксиде в присутствии гидрида натрия) происходит [261] бензилирование и уридина с образованием смеси 3-бензилуридина и 3,2′-дибензилуридина *.

Исследовано также действие бифункциональных реагентов этой группы например 1,4-ди-O-(метансульфонил)-бутандиола [259]; продукты, образующиеся при этом, аналогичны продуктам, полученным с другими бифункциональными реагентами (см. стр. 378).

При нагревании 5′-O-тозилатов производных аденозина [262], гуанозина [263] и инозина [263] происходит внутримолекулярное алкили-

* О взаимодействии рибонуклеозидов и РНК с аллилбромидом см. [859].

рование пуринового ядра по N-3 с образованием 3,5′-циклонуклеозидов:

Такие соединения были использованы при доказательстве конфигурации гликозидной связи в природных пуриновых нуклеозидах и для исследований конформации пуриновых нуклеозидов в растворах (см. гл. 2). Недавно обнаружено, что при взаимодействии нуклеозидов с гидроксиламин-O-сульфоновой кислотой NH_2OSO_3H происходит N-аминирование гетероциклического ядра. Эта реакция, осуществленная первоначально на примере урацила[349, 350], была использована для синтеза 1-аминоинозина и 1-аминогуанозина из соответствующих нуклеозидов[351].

Действие α-окисей и β-лактонов

Как известно, α-окиси чрезвычайно легко раскрываются под действием нуклеофильных агентов, причем реакция протекает по бимолекулярному механизму:

$$\underset{\diagdown O \diagup}{CH_2-CH_2} + :B \longrightarrow \left[\underset{|\atop O^-}{CH_2}-CH_2-\overset{+}{B}\right] \xrightarrow{+H^+} HOCH_2CH_2B^+$$

:B—нуклеофильный агент

Гетероциклические основания нуклеиновых кислот являются достаточно эффективными нуклеофильными агентами для участия в такой реакции. Как и в реакциях, рассмотренных в предыдущем разделе, алкилирование в данном случае происходит по атому азота, обладающему наибольшей электронной плотностью.

Взаимодействие гуанозина с окисью этилена при нагревании в диметилформамиде приводит к 7-N-(β-оксиэтил)-гуанину LXXXI[259]. Тот же продукт наряду с 7,9-ди-(β-оксиэтил)-гуанином

LXXXII образуется и при обработке дезоксигуанозина окисью этилена в значительно более мягких условиях (pH 7; 25° C)[264]. Таким образом, алкилирование по N-7 производных гуанозина сопровождается быстрым гидролизом гликозидной связи, вследствие чего первичный продукт реакции выделить не удается.

HOCH₂CH₂ O ... NH ... NH₂ ... H

LXXXI

HOCH₂CH₂ O ... NH ... NH₂ ... HOCH₂CH₂

LXXXII

Алкилирование аденозина под действием окиси этилена гладко протекает в водном растворе при pH 6,5 и комнатной температуре[265] (время полупревращения в этих условиях составляет ~13,5 *ч*). Продукт реакции идентифицирован как 1-N-(β-оксиэтил)-аденозин. При взаимодействии с аденозин-5′-трифосфатом происходит побочная реакция: алкилирование по остатку фосфорной кислоты. При этом в реакцию вступает лишь фосфомоноэфирная группа; фосфодиэфиры в этих условиях не алкилируются, и в двузамещенном пирофосфате — никотинамидадениндинуклеотиде — реакция протекает только по N-1 остатка аденина. Скорость реакции уридина с окисью этилена[266] возрастает при увеличении pH; это связано, очевидно, с участием в реакции аниона нуклеозида. При pH 8—9 реакция заканчивается за 2 дня. Первичный продукт реакции 3-N-(β-оксиэтил)-уридин подвергается дальнейшему алкилированию по гидроксильным группам остатка рибозы. При взаимодействии с окисью этилена уридин-5′-фосфата образуется 3-N-(β-оксиэтил)-уридин-5′-(β-оксиэтил)-фосфат. Реакция окиси этилена с цитидином не изучалась, однако при реакции с 1-N-метилцитозином[267] первоначально образуется 1-N-метил-3-N-(β-оксиэтил)-цитозин, который претерпевает дальнейшее алкилирование с образованием 1-N-метил-3,4-*экзо*-N-ди-(β-оксиэтил)-цитозина; последний легко дезаминируется до 1-N-метил-3-N-(β-оксиэтил)-урацила.

Таким образом, окись этилена является неспецифическим алкилирующим агентом и легко взаимодействует в мягких условиях со всеми основными компонентами нуклеиновых кислот. Однако при взаимодействии ее с РНК вируса табачной мозаики были обнаружены только продукты алкилирования гуанозина[268].

Иные результаты были получены при изучении взаимодействия нуклеозидов с окисью пропилена. По данным Пошона и Микельсона[247], этот реагент при pH 6,0 и 5° C не затрагивает аденозин

и цитидин В то же время уридин и тимидин быстро превращаются в этих условиях в соответствующие 3-N-(β-оксипропил)-производные; несколько медленнее реагирует гуанозин, образуя продукт неустановленного строения. Очень легко вступает в реакцию инозин; строение получающегося продукта также не было доказано. Окись пропилена была использована для модификации ряда полинуклеотидов[247, 268].

Действие диокиси бутадиена на гуанозин[259] приводит, как и в случае других дизамещенных алкилирующих агентов, к смеси 7-N-алкилгуанина и бис-(гуанил)-производного (см. стр. 378).

α-Окись акролеина является специфическим модифицирующим реагентом для гуанозина. В реакции участвует группировка $=C(NH_2)NH-$ гетероциклического ядра; под действием эпоксидной группы реагента происходит алкилирование по N-1. Эта реакция будет подробнее рассмотрена на стр. 412.

β-Лактоны реагируют с нуклеофильными агентами почти так же легко, как α-окиси:

$$B\!: + \underset{O-CO}{CH_2-CH_2} \longrightarrow {}^{+}B-CH_2CH_2COO^-$$

B: — нуклеофильный агент

Было изучено взаимодействие простейшего представителя этого класса соединений, β-пропиолактона с производными гуанозина, дезоксигуанозина и инозина. Как и в случае окиси этилена, из продуктов реакции с гуанозином[269], дезоксигуанозином[270] и дезоксигуанозин-5′-фосфатом[269, 270] удалось выделить лишь алкилированные основания: 7-N-(β-карбоксиэтил)-гуанин и 7,9-бис-(β-карбоксиэтил)-гуанин. При реакции с инозин-5′-фосфатом[271] направление алкилирования зависит от pH: в щелочной среде образуется 1-N-(β-карбоксиэтил)-инозин-5′-фосфат LXXXIII, в кислой — соответственно 7-N-(β-карбоксиэтил)-инозин-5′- фосфат LXXXIV:

LXXXIII (N-1: CH_2CH_2COOH; N-9: R)

LXXXIV (N-7: $^-OOCCH_2CH_2$, N^+; NH; N-9: R)

R — остаток рибозы

Алкилирование ДНК под действием β-пропиолактона протекает по остаткам дезоксигуанозина[269].

Действие эпиминов

Этиленимин и его производные обладают сильным мутагенным действием, многие противоопухолевые препараты относятся к этому классу соединений. Тем не менее взаимодействие эпиминов с нуклеиновыми кислотами изучено довольно слабо.

Как известно, эпимины, реакции которых в общем сходны с реакциями α-окисей, труднее поддаются атаке нуклеофильными агентами, и их реакции протекают обычно через промежуточное образование иммониевого иона LXXXV:

$$\underset{\text{NH}}{CH_2{-}CH_2} + H^+ \rightleftarrows \underset{\overset{+}{N}H_2}{CH_2{-}CH_2}$$

LXXXV

$$\underset{\overset{+}{N}H_2}{CH_2{-}CH_2} + :B \longrightarrow \overset{+}{B}{-}CH_2CH_2NH_2$$

:B — нуклеофильный агент

В слабощелочной среде обычные компоненты РНК не взаимодействуют с этиленимином, и при его действии на тРНК удается добиться специфической модификации по остаткам 4-тиоуридина (см. стр. 430). В нейтральной или слабокислой среде происходит алкилирование ДНК по остаткам дезоксигуанозина[272]. При реакции дезоксигуанозина с триэтиленмеламином LXXXVI образуются два вещества, первому из которых на основе данных УФ-спектра и хроматографической подвижности была приписана структура соответствующего 7-N-алкилдезоксигуанозина, а второму — структура 7-N-алкилгуанина. Другие нуклеозиды с триэтилмеламином в исследованных условиях в реакцию не вступали *.

LXXXVI

* В более ранней работе[273] утверждалось, напротив, что в реакцию с триэтиленмеламином вступают только пиримидиновые, но не пуриновые нуклеозиды.

Действие монозамещенных (β-хлорэтил)-аминов и (β-хлорэтил)-сульфидов

Монозамещенные (β-хлорэтил)-амины и (β-хлорэтил)-сульфиды чрезвычайно легко взаимодействуют с нуклеофильными агентами. Реакция протекает через промежуточное образование циклического сульфониевого LXXXVII или циклического иммониевого LXXXVIII ионов, аналогичных иону LXXXV (промежуточному продукту при алкилировании эпиминами):

$$R{-}S{-}CH_2CH_2Cl \xrightarrow[-Cl^-]{} R{-}\overset{+}{S}\underset{CH_2}{\diagdown\!\diagup}CH_2 \xrightarrow{:B} \overset{+}{B}CH_2CH_2SR$$

LXXXVII

$$R_2N{-}CH_2CH_2Cl \xrightarrow[-Cl^-]{} R_2\overset{+}{N}\underset{CH_2}{\diagdown\!\diagup}CH_2 \xrightarrow{:B} \overset{+}{B}CH_2CH_2NR_2$$

LXXXVIII

Как и эпимины, соединения этой группы, особенно дизамещенные (см ниже), являются чрезвычайно эффективными мутагенами и обладают противоопухолевой активностью. Качественно картина алкилирования компонентов нуклеиновых кислот под действием (β-хлорэтил)-аминов и (β-хлорэтил)-сульфидов сходна с наблюдаемой при реакции с диалкилсульфатами, т. е. наиболее реакционноспособным из обычных компонентов является гуанозин и в нейтральной среде алкилирование протекает по N-7 [274, 275]. Для монофункциональных азотистых ипритов LXXXIX и XC

$$(C_2H_5)_2N{-}CH_2CH_2Cl \qquad O\langle\,\rangle N{-}CH_2CH_2Cl$$

LXXXIX XC

было проведено детальное исследование кинетики реакции и структуры продуктов, получающихся при взаимодействии с нуклеозидами, нуклеотидами и полинуклеотидами [276].

С реагентом LXXXIX скорость циклизации с образованием иона LXXXVIII значительно превосходит скорость последующего алкилирования; при реакции с реагентом XC циклизация является стадией, определяющей суммарную скорость процесса.

Ниже сопоставляется относительная реакционная способность некоторых нуклеозидов при их взаимодействии с диэтил-(β-хлорэтил)-амином LXXXIX (pH 7, 40° C) [276]:

	Эффективность алкилирования *
Гуанозин	3000
Аденозин	850
Дезоксицитидин	500—600
Тимидин	40

* Отношение констант скоростей реакции алкилирования катиона LXXXVIII ($R=C_2H_5$) и реакции его гидролиза (вторая константа в условиях опыта равна $2 \cdot 10^{-8}$ *сек*$^{-1}$).

Как видно из этих данных, реакционная способность нуклеозидов по отношению к LXXXIX падает в ряду гуанозин>аденозин>>дезоксицитидин>тимидин. Аналогичная картина наблюдается и для других алкилирующих агентов (за исключением диазометана). Большинство выделенных после реакции веществ соответствует ожидаемым продуктам алкилирования (после кислотного гидролиза были получены 7-N-алкилгуанин, 3-N-алкилцитозин и 3-N-алкилтимин) или продуктам упомянутых выше побочных реакций — раскрытия имидазольного цикла в алкилгуанозине (см. стр. 362, подробнее стр. 437) или расщепления гликозидной связи и последующего алкилирования (7,9-диалкилгуанин). Имеются, однако, и интересные исключения. После кислотного гидролиза продуктов реакции LXXXIX с аденозином и его производными 1-N-(диэтиламиноэтил)-аденин не был обнаружен, а найден лишь 6-*экзо*-N-диэтиламиноэтиладенин XCI. Образование последнего соединения можно объяснить легкой перегруппировкой первичного продукта реакции (см. стр. 450), которая в данном случае легко протекает уже при pH 7 за счет внутримолекулярного катализа под действием диэтиламиногруппы алкильного заместителя. Алкилирование тимидина LXXXIX дает помимо нормального продукта реакции XCIIа также соединение XCIIб, возникающее в результате дальнейшего алкилирования аминогруппы в боковой цепи.

$NHCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$

XCI

H_3C, O, N, R', O, N, R

XCII

а) $R' = CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$

б) $R' = CH_2CH_2\overset{+}{N}(C_2H_5)_2$ — $CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$

R — остаток дезоксирибозы

При алкилировании нуклеотидов происходит в заметной степени и побочная реакция замещения по фосфатным группам; соответствующие продукты, однако, не были выделены, и об их образовании судили лишь по увеличению скорости распада алкилирующего агента. При алкилировании тимидин-5'-фосфата наряду с продуктами, аналогичными XCIIа и XCIIб, отмечено неожиданное образование 1-N-(диэтиламиноэтил)-тимина XCIII. Предполагается, что это соединение возникает за счет первоначального алкилирования по фосфатной группе и последующего внутримолеку-

лярного переноса алкильного остатка с расщеплением N-гликозидной связи.

$(C_2H_5)_2NCH_2CH_2$–O–P(O)(OH)–OCH_2 (дезоксирибоза, HO) – тимин (H_3C, NH, O) ⟶ H_3C-тимин-N–$CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$

XCIII

При переходе от нуклеозидов и мононуклеотидов к полинуклеотидам скорость реакции с монозамещенными азотистыми ипритами увеличивается. Так, алкилирование остатков аденозина в полиадениловой кислоте протекает приблизительно в 2,5 раза быстрее, чем в нуклеозиде. При проведении реакции с денатурированной ДНК образуются приблизительно равные количества продуктов алкилирования гуанина и аденина, в случае же нативного двухцепочечного полимера первоначально алкилируется только гуанин. При этом алкилирование остатков гуанина в денатурированной ДНК протекает приблизительно в 7 раз быстрее, а в нативной ДНК — почти в 50 (!) раз быстрее, чем алкилирование гуанозина. Причины столь резкого повышения реакционной способности при переходе от мономера к полимеру не ясны. Этот эффект может возникать за счет локального повышения концентрации реагента вследствие полианионных свойств ДНК или он может быть связан с изменением электронных свойств остатка основания за счет межплоскостных взаимодействий.

Высокая эффективность монозамещенных производных иприта и азотистого иприта как алкилирующих агентов для полинуклеотидов и относительно узкая специфичность реакции позволяют предполагать, что этот тип алкилирующих агентов может быть успешно использован для химической модификации нуклеиновых кислот. Предложено применение диэтил-(β-хлорэтил)-амина для «метки» положения остатков гуанина вдоль цепей и их последующего детектирования в ДНК с помощью электронной микроскопии[277].

Для повышения избирательности алкилирования полинуклеотидов разрабатываются модифицирующие агенты, содержащие «адресующую группу»[278], т. е. остаток моно- или олигонуклеотида, который за счет комплементарного взаимодействия с определенным участком полинуклеотидной цепи направлял бы действие алкилирующего агента по данному месту цепи. Примером подобного реагента может служить *п*-[N-(β-хлорэтил)-N-метиламино]-бензилиденуридин XCIV[279]; получены также аналогичные производные

уридин-5′-метилфосфата [280], UpU, dTpU и dTpdTpU [281, 282]. Эти соединения, так же как и простые ацетали *n*-[N-(β-хлорэтил)-N-метиламино]-бензальдегида, оказались способными проводить алкилирование остатка гуанозина в тРНК [283–286]. Однако вопрос о том, насколько повышается специфичность алкилирования при введении в молекулу реагента «адресующей группы», остается пока невыясненным.

XCIV

Действие ди- и тризамещенных алкилирующих агентов

Наиболее известными реагентами данного типа являются иприт и дизамещенный азотистый иприт. Первичными продуктами при взаимодействии реагентов такого типа с нуклеозидами являются, очевидно, соответствующие β-хлорэтилтиоэтил- и β-хлорэтилалкиламиноэтилнуклеозиды типа XCV, которые в дальнейшем могут либо гидролизоваться до соответствующих β-оксиэтильных производных XCVI, либо алкилировать вторую молекулу нуклеозида с образованием продуктов типа XCVII:

$$X(CH_2CH_2Cl)_2 + :B \longrightarrow [\overset{+}{B}-CH_2CH_2-X-CH_2CH_2Cl]$$

XCV

H_2O ; $:B$

$$\overset{+}{B}-CH_2CH_2-X-CH_2CH_2OH \qquad \overset{+}{B}-CH_2CH_2-X-CH_2CH_2-\overset{+}{B}$$

XCVI XCVII

X = S или NAlk

:B — нуклеофильный агент (нуклеозид)

Алкилированные основания XCVI и XCVII (В — остаток 7-N-гуанина) были получены после обработки гуанозина ипритом[274] или ди-(β-хлорэтил)-метиламином[259]. При алкилировании такими агентами полинуклеотидов реакция направляется в первую очередь по остаткам гуанина. При обработке ДНК азотистыми ипритами с последующим мягким кислотным гидролизом из образовавшихся продуктов, наряду с 7-N-алкилгуанинами и ди-(гуанил-7-N)-этилпроизводными[275], было обнаружено небольшое количество соединений, аналогичных по УФ-спектрам 7-N-алкилгуанинам, но отличающихся заметно большей основностью[287]. Строение этих последних продуктов не было доказано, но возможно, что они возникают за счет дальнейшего алкилирования третичного азота в боковой цепи (подобно XCIIа и XCIIб). Было найдено также небольшое количество соединений, являющихся, по-видимому, продуктами алкилирования аденина, однако строение их опять-таки не доказано[287].

Таблица 5.5. **Алкилирование ДНК тимуса теленка под действием иприта и азотистых ипритов (рН 7,5; 2,4 *моль* алкилирующего агента на 1 *моль* фосфатных групп ДНК)**[287]

Реагент	Время реакции, ч	Степень алкилирования гуанина *, %	Состав оснований производных гуанина **, %: гуанин	7-N алкилгуанин XCVI	производное XCVII	неидентифицированный продукт алкилирования
$(ClCH_2CH_2)_2S$	0,67	30	13,0	6,0	2,6	—
	3	54	8,4	6,4	3,6	—
$(ClCH_2CH_2)_2NH$	1,5	18	17,7	1,1	2,2	0,8
$(ClCH_2CH_2)_2NCH_3$	1,5	53	10,3	3,7	6,3	1,1
$(ClCH_2CH_2)_2N(\rightarrow O)CH_3$	6	18	15,0	1,6	1,8	—
$(ClCH_2CH_2)_3N$	1,5	73	5,9	4,1	10,2	2,3
5-$CH_2N(CH_2CH_2Cl)_2$-урацил (структурная формула)	1,5	61	9,3	3,0	9,3	2,3

* От суммы всех оснований в полинуклеотиде.

** От суммы гуанина и его метилированных производных в продуктах реакции после кислотного гидролиза.

Взаимодействие иприта и азотистых ипритов с полинуклеотидами протекает чрезвычайно быстро и в мягких условиях [268] (табл. 5.5). Продукты алкилирования ДНК уже при нейтральных pH могут разлагаться с расщеплением N-гликозидной связи [287]. После обработки щелочью они претерпевают расщепление имидазольного цикла (см. стр 437), что приводит к повышению устойчивости N-гликозидной связи [289].

При алкилировании ДНК под действием иприта бис-(гуанил)-этильные производные образуются за счет остатков гуанина, содержащихся в различных цепях двухцепочечного комплекса [275, 290]. Вследствие этого уже при очень малой степени алкилирования ДНК теряет способность к денатурации с полным расхождением цепей. Аналогичная картина наблюдается и в начальной стадии реакции ДНК с бис-(β-хлорэтил)-метиламином [291]. При более высокой степени алкилирования производные типа XCVII, по-видимому, образуются в заметно бóльших количествах за счет алкилирования соседних остатков гуанина в одной и той же полинуклеотидной цепи [288].

Было исследовано взаимодействие полинуклеотидов и с дизамещенными алкилирующими реагентами других типов. Алкилирование гуанозина [259] и ДНК [290] под действием диокиси бутадиена дает после кислотного гидролиза смесь 7-N-(β, γ, δ-триоксибутил)-гуанина и α,δ-ди-(гуанил-7-N)-β,γ-бутандиола. При обработке ДНК низкими концентрациями последнего реагента и бис-(β,γ-эпокси)-пропилового эфира двухцепочечный комплекс ДНК теряет способность к денатурации [291].

1,4-Димезилоксибутан, применяющийся как противоопухолевое средство (милеран), намного менее эффективен в качестве агента, вызывающего алкилирование и ковалентное соединение цепей ДНК [275, 291], чем указанные выше агенты. В этом случае при реакции с РНК и ДНК после кислотного гидролиза были обнаружены 7-N-(δ-оксибутил)-гуанин и α,δ-ди-(гуанил-7-N-)-бутан [275].

2. Взаимодействие с реагентами, содержащими поляризованные C=C-связи

Как известно, олефины, содержащие сильные электроноакцепторные заместители, достаточно легко вступают в реакции нуклеофильного присоединения:

$$:B + CH_2{=}CHX \rightarrow [B{-}CH_2\bar{C}HX] \xrightarrow{+H^+} B{-}CH_2CH_2X$$

В качестве нуклеофильных агентов в такого рода реакциях могут выступать и некоторые нуклеозиды и нуклеотиды, причем в результате обычно образуются продукты, содержащие группировку $-CH_2CH_2X$ у атома азота гетероциклического кольца. Из реакций такого типа лучше всего изучено взаимодействие нуклеозидов и нуклеотидов с акрилонитрилом [292–295]. Эта реакция проте-

кает в мягких условиях и может быть легко применена для модификации полинуклеотидов.

Легче всего взаимодействуют с акрилонитрилом редкие компоненты тРНК — псевдоуридин [292–295], инозин [294, 295] и 4-тиоуридин [295]; реакция гладко протекает уже в слабощелочной среде. Из псевдоуридина образуется 1-цианэтилпсевдоуридин XCVIII, который в дальнейшем медленно превращается в 1,3-дицианэтильное производное XCIX. Продуктом реакции с инозином является 1-цианэтилинозин C; в случае же 4-тиоуридина цианэтилирование протекает по атому серы (см. стр. 428).

$CH_2{=}CHCN$

XCVIII

XCIX

$CH_2{=}CHCN$

C

R — остаток рибозы

Из обычных компонентов РНК в этих условиях с акрилонитрилом взаимодействует лишь уридин [292–295], давая 3-цианэтильное производное CI.

$CH_2{=}CHCN$

CI

R — остаток рибозы

Эта реакция протекает, однако, заметно медленнее, чем реакция с упомянутыми выше редкими компонентами; еще медленнее реагируют 5-метилуридин (риботимидин)[295] и тимидин[295]. Цитидин, аденозин и гуанозин не подвергаются цианэтилированию по азоту гетероциклического ядра. В сильнощелочной среде или при очень длительном выдерживании при pH 8,5 они все же дают небольшое количество продуктов реакции, являющихся, по-видимому, O-цианэтильными производными — за счет реакции по гидроксильным группам остатка сахара.

Скорость реакции нуклеозидов с акрилонитрилом сильно зависит от величины pH среды. При детальном исследовании кинетики этой реакции обнаружено, что цианэтилированию подвергается только анион нуклеозида, обладающий значительно большей нуклеофильностью, чем неионизованная форма. Константы скорости взаимодействия акрилонитрила с рядом нуклеозидов (k) и их анионами $\left[k_{ан} = k\left(1 + 10^{pK_a - pH}\right)\right]$ приведены в табл. 5.6.

Таблица 5.6. **Константы скорости псевдопервого порядка реакции взаимодействия акрилонитрила с нуклеозидами и их анионами (1 *М* раствор акрилонитрила, 0,05 *М* карбонат-бикарбонатный буфер, 30° С)**[295]

Нуклеозид	$k \cdot 10^3$ (при pH 9,3), *мин*$^{-1}$	$k_{ан} \cdot 10^3$, *мин*$^{-1}$	Нуклеозид	$k \cdot 10^3$ (при pH 9,3), *мин*$^{-1}$	$k_{ан} \cdot 10^3$, *мин*$^{-1}$
Псевдоуридин	11,1	16,3	Тимидин	0,12	0,48
Инозин	12,5	16,8	Аденозин	0,12	—
4-Тиоуридин	4,6	4,85	Гуанозин	~0,07 } pH 9,7	—
Уридин	0,39	0,73	Цитидин	~0,08 } pH 9,7	—
5-Метилуридин	0,15	0,47			

Как видно из приведенных данных, модификация нуклеозидов под действием акрилонитрила весьма специфична и протекает в мягких условиях, исключающих разрыв фосфодиэфирной связи. Это позволяет применить рассматриваемую реакцию для изучения вторичной структуры тРНК и для функциональных исследований.

Скорость модификации остатков псевдоуридина в тРНК зависит от вторичной структуры полимера. При взаимодействии акрилонитрила с суммарной тРНК из дрожжей в диметилсульфоксиде, содержащем 10—50% воды, степень модификации псевдоуридина в стандартных условиях увеличивается по мере увеличения содержания воды[296], что связано с изменением вторичной структуры. Параллельно происходит уменьшение акцепторной активности тРНК из дрожжей. При модификации тРНК в смеси воды и диметилформамида в присутствии хлористого натрия в реакцию всту-

пает приблизительно $^1/_3$ остатков псевдоуридина[297]; в присутствии хлористого магния скорость реакции с псевдоуридином заметно уменьшается и можно подобрать условия, при которых происходит лишь селективная модификация по остаткам инозина. Различие в реакционной способности остатков псевдоуридина в тРНК по отношению к действию акрилонитрила было показано и при модификации индивидуальной аланиновой тРНК из дрожжей[298], содержащей 1 остаток инозина и 2 остатка псевдоуридина. В этом случае цианэтилирование протекает в первую очередь по остатку инозина, а затем по остатку псевдоуридина, не входящему в «универсальную» для всех тРНК последовательность pGpTpΨpC (см. стр. 291). Специфическая модификация тРНК по остаткам инозина и псевдоуридина по-разному влияет на их способность акцептировать аминокислоты и связываться с рибосомами в присутствии соответствующих тринуклеозиддифосфатов[298, 299].

Аналогично акрилонитрилу взаимодействуют с инозином и некоторые другие производные акриловой кислоты. При реакции 2′,3′-O-изопропилиденинозина с метилакрилатом и акриловым ангидридом были получены соответственно 1-карбметоксиэтил- и 1-карбоксиэтил-2′,3′-O-изопропилиденинозины[300]. Обработка акриловым ангидридом 2′,3′-O-изопропилиденуридина и тимидина приводит лишь к соответствующим 5′-O-акрилоилпроизводным.

3. Взаимодействие с реагентами, содержащими связи C = N

Единственной известной реакцией такого типа является взаимодействие нуклеозидов с солями N-циклогексил-N′-(метилморфолиний)-этилкарбодиимида CII. В реакцию вступают нуклеозиды, содержащие в гетероциклическом ядре группировку —CONH—[301, 302]; в случае уридина при этом образуется 3-N-замещенное производное CIII[301–303].

$$\text{уридин (R)} + C_6H_{11}N{=}C{=}NCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)(\text{морфолин})\ TsO^- \longrightarrow \text{3-N-}[C(=NC_6H_{11})NHCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)(\text{морфолин})]\text{-уридин}\ TsO^-$$

CII CIII

R—остаток углевода

Показано протекание аналогичной реакции для производных гуанозина[301, 302], дезоксигуанозина[302], тимидина[302], инозина[304] и псевдоуридина[305]; в последнем случае образуется смесь 3-моно- и

1,3-дизамещенного нуклеозида. Реакция быстро протекает в слабощелочной среде. Изучение зависимости скорости реакции от pH показывает, что в реакции принимает участие анион нуклеозида. Скорость реакции уменьшается в ряду: инозин>уридин>гуанозин[304] (табл. 5.7).

Таблица 5.7. **Константы скорости псевдопервого порядка для реакции нуклеозидов и полинуклеотидов с тозилатом СII (0,1 *М* трис-HCl-буфер; pH 8,0; 23° С; 0,01 *М* Mg^{2+})**

Нуклеозид или полинуклеотид	$k \cdot 10^3$, *мин*$^{-1}$		Нуклеозид или полинуклеотид	$k \cdot 10^3$, *мин*$^{-1}$	
	0,047 *М* СII	0,188 *М* СII		0,047 *М* СII	0,188 *М* СII
Уридин	3,4	13,7	Полиуридиловая кислота	2,2	8,8
Гуанозин	2,2	8,8	Валиновая тРНК[1] из дрожжей	1,7	1,7
Инозин	9,3	37,2			

Аддукты, образующиеся из нуклеозидов и карбодиимида СII, разлагаются в слабощелочной среде с регенерацией нуклеозида. Исключение составляет 3-монозамещенное производное псевдоуридина, которое устойчиво к действию разбавленного аммиака[305]. Благодаря этому обстоятельству становится в принципе возможной специфическая модификация тРНК по остаткам псевдоуридина после обработки ее карбодиимидом СII и выдерживания в слабощелочной среде. Экспериментальная проверка такой возможности, однако, еще не проведена.

При pH ниже 7 взаимодействие нуклеотидов с карбодиимидом СII протекает по фосфатной группе, что в основном приводит к превращению нуклеозид-2′(3′)-фосфатов в циклические фосфаты, а нуклеозид-5′-фосфатов — в олигонуклеотиды[307]. Однако в случае фосфодиэфиров побочная реакция по фосфатной группе не наблюдается, что позволяет успешно применять карбодиимид СII для модификации полинуклеотидов.

Одноцепочечные полинуклеотиды, в которых отсутствуют внутримолекулярные водородные связи между основаниями (например, полиуридиловая кислота), гладко реагируют с карбодиимидом СII[304, 308]; скорость реакции при этом несколько ниже, чем для уридина (см. табл. 5.7). С двухцепочечными комплексами рибополинуклеотидов и ДНК реакция практически не происходит[308]. Скорость и степень взаимодействия карбодиимида СII с тРНК сильно зависит от условий реакции[306]. При pH 8 и 30—40° С достигается полная модификация всех реакционноспособных остатков нуклеозидов; в присутствии же ионов Mg^{2+} при более низкой тем-

пературе степень модификации невелика и зависит от концентрации реагента[304]. Найдено, что при реакции карбодиимида СII с индивидуальной аланиновой тРНК из дрожжей в присутствии ионов магния модификации на участке последовательности pTpΨpCpGpApU не происходит[309]. Проведена и специфическая частичная модификация 5S РНК из *E. coli* под действием карбодиимида[361]. О реакции карбодиимида с нуклеотидами и тРНК см. также[362].

Модификация полинуклеотидов карбодиимидом приводит к существенному изменению их способности расщепляться нуклеазами. Динуклеотиды, содержащие остаток модифицированного уридина, устойчивы к действию панкреатической пиримидил-РНК-азы[301, 302]. Это позволяет осуществить специфическое химико-ферментативное расщепление РНК по остаткам цитидиловой кислоты[302, 310, 311], что было использовано при установлении строения 5S РНК из *E. coli* (см. стр. 78) и для препаративного получения тринуклеотидов, содержащих на 3′-конце остаток цитидина[310]. Динуклеотиды, содержащие на 3′-конце остаток модифицированного карбодиимидом уридина или псевдоуридина, устойчивы к действию фосфодиэстераз змеиного яда и селезенки[305].

Сильная зависимость хода реакции с карбодиимидом СII от вторичной структуры и ограничение действия нуклеаз после модификации позволяют использовать реакцию с этим карбодиимидом для обнаружения полинуклеотидных участков, на которых происходит разрушение двухцепочечного комплекса при частичной денатурации ДНК[312]. После обработки ДНК карбодиимидом СII, а затем панкреатической ДНК-азой и фосфодиэстеразой змеиного яда удается выделить длинные олигонуклеотиды, возникающие из «дефектных» участков полимера.

4. Взаимодействие с реагентами, содержащими С=О-группы

Ангидриды и хлорангидриды органических кислот, а также альдегиды взаимодействуют с нуклеозидами и нуклеотидами так, что электрофильная атака обычно направляется по экзоциклической аминогруппе основания или по гидроксильным группам остатка сахара. Такие реакции подробно рассмотрены в гл. 6 и 9. В некоторых случаях, однако, атака идет по атомам азота гетероциклического ядра.

Ацилирование. При бензоилировании уридина и тимидина действием бензоилхлорида в пиридине образуются соответственно 2′,3′,5′-три-О- и 3′,5′-ди-О-бензоильные производные. В присутствии избытка ацилирующего агента образуются продукты, содержащие еще одну бензоильную группу[195], которые, по-видимому, являются

3,2′,3′,5′-тетрабензоилуридином CIVa и 3,3′,5′-трибензоилтимидином CV:

CIV

а (R = Bz) б (R = H)

CV

N-Бензоильная группа в подобных соединениях устойчива к действию разбавленных кислот; благодаря этому удается исчерпывающим бензоилированием 5′-O-тритилуридина и последующим кислотным гидролизом получить 3,2′,3′-трибензоилуридин CIVб[313].

Ацилирование цитидина протекает в первую очередь по экзоциклической аминогруппе (см. стр. 403), а затем по гидроксильным группам остатка сахара. В более жестких условиях удается получить 3,4-*экзо*-N, 2′,3′,5′-пентабензоилцитидин CVI[314]. Аналогичные продукты бензоилирования (CVII) получены из аденозина[315, 316] и 2′-дезоксиаденозина[317].

CVI

CVII

(R = H или OBz)

Эти соединения легко теряют бензоильную группу, связанную с азотом гетероциклического ядра при мягкой щелочной обработке.

Действие формальдегида. При взаимодействии формальдегида с нуклеозидами и нуклеотидами образуются производные несколь-

ких типов (см. стр. 322 и 409). Наиболее быстро протекающей реакцией является образование N-метилольных производных по азоту гетероциклического ядра, связанному с водородом, как это показано ниже на примере производных уридина [318, 319]:

$$\text{(урацил-R: O, NH, N–R, O)} + CH_2O \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{(O, N–}CH_2OH\text{, N–R, O)}$$

R — остаток рибозы или рибозофосфата

Протекание этой реакции сопровождается характерными изменениями в УФ-спектре (рис. 5.4). Аналогичная реакция наблюдалась для тимидина [319], инозина и его производных [319, 320] и псевдоуридина [319]; в последнем случае анализ изменения УФ-спектра показывает, что происходит образование двух типов производных (видимо, за счет реакции по атомам N-1 и N-3).

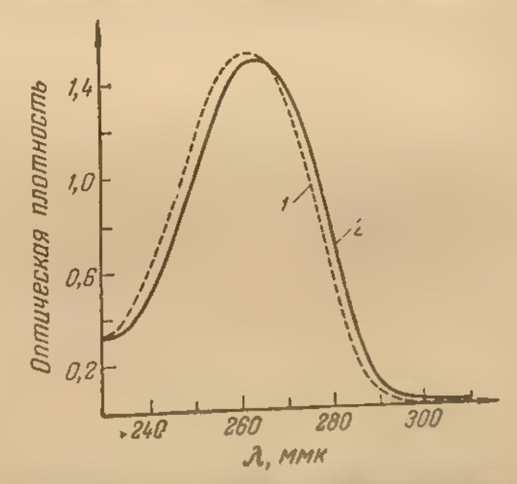


Рис. 5.4. УФ-Спектр уридина при pH 6,9 до (кривая 1) и после обработки 0,33 M раствором формальдегида (кривая 2).

В нейтральных и слабощелочных растворах реакция формальдегида с нуклеозидами и нуклеотидами протекает практически мгновенно [319]; в слабокислой среде она замедляется настолько, что удается измерить константу скорости образования метилольного производного (k) и константу равновесия реакции с формальдегидом (K) (табл. 5.8). Скорость обратной реакции также велика, и после удаления избытка формальдегида продукты реакции полностью разлагаются.

Значения константы равновесия для реакции формальдегида с уридин-5′-фосфатом близки к соответствующим значениям для реакции с аденозином, гуанозином и цитидином, протекающей по экзоциклической аминогруппе (см. стр. 409); скорость же реакции производных уридина значительно выше в одинаковых условиях. Реакция формальдегида с уридином в составе полиуридиловой кислоты протекает в 2,5—3 раза медленнее, чем реакция с уридин-5′-фосфатом (см. табл. 5.8).

Таблица 5.8. **Константы скорости реакции * и константы равновесия ** при взаимодействии формальдегида с производными уридина (0,1 *M* ацетатный буфер, pH 4,68)**[318]

Нуклеотидный компонент реакции	Температура, °C	$k \cdot 10^4$, $сек^{-1}$	*K*, *л/моль*	Нуклеотидный компонент реакции	Температура, °C	$k \cdot 10^4$, $сек^{-1}$	*K*, *л/моль*
Уридин-5′-фосфат	10	1,78	3,2 ***	Полиуридиловая кислота	10	0,84	—
	20	6,52	2,43		20	2,01	—
	30	21,0	1,80		30	8,91	—
	40	61,0	1,33		40	21,9	—
	50	164,0	1,02		50	60,8	—

* $k = k_1 [CH_2O] + k_{-1}$ определена спектрофотометрическим методом при реакции с 1 *M* раствором формальдегида.

** $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$ определена методом pH-статирования.

*** Определена спектрофотометрическим методом.

Атом азота гетероциклического ядра гуанозина участвует также в реакциях с α-дикарбонильными соединениями (см. гл. 6).

5. Окисление перкислотами

Как известно, органические перкислоты способны в кислой или нейтральной среде диссоциировать с образованием катиона гидроксила OH^+. Электрофильная атака этим катионом молекулы третичных аминов приводит к образованию N-окисей:

$$RCOO{-}OH \longrightarrow RCOO^- + OH^+$$

$$R'_3N\colon + OH^+ \longrightarrow [R'_3\overset{+}{N}{-}OH] \longrightarrow R'_3N{\rightarrow}O + H^+$$

R и R′ — различные органические радикалы

Такого рода реакции известны и для производных нуклеозидов. Окисление аденозина и его производных под действием смеси перекиси водорода и уксусной кислоты гладко приводит к производным 1-N-окиси аденозина CVIII [321–324]; действующим началом в этой реакции, по-видимому, является перуксусная кислота.

$\xrightarrow{H_2O_2 + CH_3COOH}$ CVIII

R — остаток рибозы

В еще более мягких условиях протекает окисление производных аденозина под действием моноперфталевой кислоты[325, 326]; с этим реагентом удается провести реакцию при pH 5—7. При взаимодействии цитидина с моноперфталевой[327] или *м*-хлорпербензойной[328] кислотой образуется 3-N-окись цитидина CIX:

ArCOO—OH

CIX

R — остаток рибозы

Окисление до N-окисей аденозина и цитидина протекает быстро в слабокислой среде. Оптимум pH для реакции *м*-хлорпербензойной кислоты с аденозином находится при pH 5,5, а с цитидином — при pH 6,0; скорости реакции с обоими нуклеозидами близки[329]. Другие основные компоненты нуклеиновых кислот в этих условиях не подвергаются окислению*. Напротив, в слабощелочной среде гуанозин, уридин и тимидин взаимодействует с перекисью водорода и перкислотами с расщеплением гетероциклического ядра[329] (см. стр. 478). Взаимодействие редких компонентов РНК с перкислотами не изучалось.

Характерным свойством N-окисей гетероциклических оснований является крайне легкая способность подвергаться атаке под действием нуклеофильных агентов. При действии 1 н. раствора щелочи 1-N-окиси производных аденозина претерпевают расщепление пиримидинового кольца с образованием производных 4-аминоимидазол-5-карбоксамидоксима CX[322, 323].

CX

R — остаток рибозы

В еще более мягких условиях происходит расщепление гетероциклического ядра в молекуле 3-N-окиси цитидина[331]. Строение

---

* Описано, однако, окисление гуанина до 7-N-окиси гуанина под действием перекиси водорода в трифторуксусной кислоте[330].

продукта реакции в этом случае не было установлено, однако, по-видимому, он тоже образуется за счет отщепления атома С-2.

Превращение 1-N-окиси аденозина в имидазольное производное СХ легко протекает и в слабокислой среде. Дезаминирование 1-N-окиси аденозина до 1-N-окиси инозина CXI удается осуществить только в чрезвычайно мягких условиях[330, 332, 333]. При действии же нитрита натрия в уксусной кислоте образуется 1-N-окись 2-азааденозина CXII (за счет промежуточного раскрытия пиримидинового цикла и последующей циклизации)[334]:

CXI ← [1-N-окись аденозина] → CXII

R–остаток рибозы

При гидрировании над никелевым катализатором N-окиси производных аденозина гладко переходят в соответствующие производные аденозина[323].

Мягкие условия, используемые при окислении нуклеозидов мопоперфталевой кислотой, позволяют успешно применить эту реакцию для модификации полинуклеотидов[335, 363]. Так, окисление полиадениловой кислоты этим реагентом при pH 7 до 20° C заканчивается за 1,5—2 *ч*. При использовании эквимольных количеств моноперфталевой кислоты достигается модификация 13% остатков аденозина, при использовании десятикратного (в мольном соотношении) избытка перкислоты степень модификации возрастает до 86%. Полицитидиловая кислота в этих условиях окисляется заметно медленнее полиадениловой, и степень модификации здесь ниже.

Двухспиральные комплексы полинуклеотидов окисляются моноперфталевой кислотой в заметно меньшей степени, чем односпиральные полинуклеотиды, как можно судить по различной степени модификации нативной и денатурированной ДНК, а также полиадениловой кислоты и комплекса (поли-А) · (поли-U). Вследствие этого модификация моноперфталевой кислотой может быть применена для определения размеров односпиральных участков в полинуклеотидах. Такие исследования были выполнены для суммарной тРНК из дрожжей[336] и для компонентов рибосомальной РНК[337]. О применении к индивидуальной тРНК — см.[364].

Модификация перкислотами может быть использована для специфического расщепления ДНК по остаткам дезоксицитидина [331], поскольку остаток 3-N-окиси дезоксицитидина при обработке щелочью претерпевает расщепление гетероциклического ядра. В продукте этой реакции, строение которого не установлено, N-гликозидная связь легко расщепляется под действием 50%-ной уксусной кислоты, что приводит к полимеру, содержащему остатки дезоксирибозы на месте остатков дезоксигуанозина в исходной цепи. Этот лишенный цитозина полимер при обработке щелочью может расщепляться по пути β-элиминации (см. стр. 575 сл.). Такая последовательность реакций была осуществлена для динуклеотида dpCdpT [331].

При взаимодействии аденина, аденозина, дезоксиаденозин-5′-фосфата, олигодезоксиадениловых кислот и ДНК с разбавленными растворами перекиси водорода в слабощелочной среде также происходит образование N-окисей производных аденина [161, 162, 338]. В этом случае, однако, окисление проходит, по-видимому, по гомолитическому механизму и продуктом реакции является 7-N-окись CXIII [338].

CXIII

R — остаток дезоксирибозофосфата

Реакция протекает довольно медленно: при pH 7,4 время полупревращения дезоксиаденозин-5′-фосфата в 0,05 *M* растворе перекиси водорода составляет около 50 *ч*. Выход 7-N-окиси дезоксиаденозин-5′-фосфата невелик, так как идут многочисленные побочные процессы (расщепление N-гликозидной связи, окисление по C-2 и C-8 аденинового ядра). Стабильность 7-N-окиси дезоксиаденозин-5′-фосфата по отношению к кислотному и щелочному гидролизу не отличается заметно от устойчивости исходного нуклеотида; при облучении УФ-светом 7-N-окись аденина переходит в 8-оксиаденин [338].

Образование 7-N-окиси аденина наблюдалось при облучении водных растворов аденина рентгеновскими лучами [338]. Возможно, что 7-N-окись аденина и его производных возникает и при других реакциях, в которых могут образовываться OH-радикалы, например при действии разбавленных растворов гидроксиламина на производные аденозина [160].

ЛИТЕРАТУРА

1. Visser D. W., Dittmer K., Goodman J., J. Biol. Chem., 171, 377 (1947).
2. Fukuhara T. K., Visser D. W., J. Biol. Chem., 190, 95 (1951).
3. Visser D. W., Frisch D. M., Huang B., Biochem. Pharmac., 5, 157 (1960).
4. Michelson A. M., Dondon J., Grunberg-Manago M., Biochim. Biophys. Acta, 55, 529 (1962).
5. Grunberg-Manago M., Michelson A. M., Biochim. Biophys. Acta, 80, 431 (1964).
6. Letters R., Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1962, 71.
7. Fukuhara T. K., Visser D. W., J. Am. Chem. Soc., 77, 2393 (1955).
8. Frisch D. M., Visser D. W., J. Am. Chem. Soc., 81, 1756 (1959).
9. Duval J., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., 46, 1059 (1964).
10. Wang S. Y., Photochem. Photobiol., 1, 37 (1962).
11. Chang P. K., Welch A. D., Biochem. Pharmac., 6, 50 (1961).
12. Bessman M. J., Lehman J. R., Adler J., Zimmerman S. B., Simms E. S., Kornberg A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 44, 633, 641, 1191 (1958).
13. Prusoff W. H., Holmes W. L., Welch A. D., Cancer Res., 13, 221 (1953).
14. Prusoff W. H., Biochim. Biophys. Acta, 32, 295 (1959).
15. Berens K., Shugar D., Acta Biochem Polon., 10, 25 (1963).
16. Massaglia A., Rosa U., Sosi S., J. Chromatogr., 17, 316 (1965).
17. Hampton E. B., Rich M. A., Eidinoff M. L., J. Biol. Chem., 235, 3562 (1960).
18. Silvester D. J., White N. D., Nature, 200, 65 (1963).
19. Hugher W. L., Commerford S. L., Gitlin D., Krueger R. C., Schultze B., Shah V., Reilly P., Fed. Proc., 23, 640 (1964).
20. Michelson A. M., in «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», v. 1, Zorbach W. W., Tipson R. S. (eds), N. Y.—L., 1968, p. 491.
21. Chang P. K., Welch A. D., J. Med. Chem., 6, 428 (1963).
22. Chang P. K., Welch A. D., Biochem. Pharmac., 8, 327 (1961).
23. Chang P. K., J. Org. Chem., 30, 3913 (1965).
24. Lipkin D., Howard F. B., Nowatny D., Sano M., J. Biol. Chem., 238, PC2249 (1963).
25. Ascoli F., Kahan F. M., J. Biol. Chem., 241, 428 (1966).
26. Yoshida H., Duval J., Ebel J. P., Biochim. Biophys. Acta, 161, 13 (1968).
27. Duval J., Ebel J. P., C. r., D263, 1773 (1966).
28. Duval J., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., 49, 1665 (1967).
29. Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1958, 1957.
30. Smrt J., Sorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., 25, 553 (1960).
31. Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon, 8, 363 (1961).
32. Ukita T., Irie M., Chem. Pharm. Bull., 8, 81 (1960); 9, 217 (1961).
33. Nowotny D., Lipkin D., Monatsch., 96, 125 (1965).
34. Jones A. S., Woodhouse D. L., Nature, 183, 1603 (1959).
35. Suzuki T., Ito E., J. Biochem. (Tokyo), 45, 403 (1958).
36. Баев А. А., Мирзабеков А. Д., Горшкова В. И., Венкстерн Т. В., ДАН СССР, 152, 331 (1963).
37. Brammer K. W., Biochim. Biophys. Acta, 72, 217 (1963).
38. Shapiro R., Agarwal S. C., Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 401 (1966).
39. Holmes R. E., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 86, 1242 (1964).
40. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1965, стр. 48.

41. Ikehara M., Tada H., Muneyama K., Chem. Pharm. Bull., 13, 639 (1965).
42. Ikehara M., Tada H., Muneyama K., Kaneko M., J. Am. Chem. Soc., 88, 3165 (1966).
43. Ikehara M., Uesugi S., Kaneko M., Chem. Comm., 1967, 17.
44. Fox J. J., Shugar D., Biochim. Biophys. Acta, 9, 369 (1952).
45. Ueda T., Chem. Pharm. Bull., 8, 455 (1960).
46. Wang S. Y., J. Am. Chem. Soc., 81, 3786 (1959).
47. Otter B. A., Falco E. A., Fox J. J, Tetrahedron Letters, 1968, 2967.
48. Smith D. A., Roy-Burman P., Visser D. W., Biochim. Biophys. Acta, 119, 221 (1966); Roberts M., Visser D W., J. Am. Chem. Soc., 74, 668 (1952).
49. Visser D. W., in «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», v. 1, Zorbach W. W., Tipson R. S., (eds), New York — London — Sydney — Toronto, 1968, p. 407.
50а. Visser D. W., in «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», v. 1, Zorbach W. W., Tipson R. S. (eds), New York — London — Sydnay — Toronto, 1968, p. 410.
50б. Friedland M., Visser D. W., Biochim. Biophys. Acta, 51, 148 (1961).
50в. Beltz R. E., Visser D. W., J. Biol. Chem., 226, 1035 (1956).
51. Holmes R. E., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 87, 1772 (1965).
52. Ikehara M., Muneyama K., Chem. Pharm. Bull., 14, 46 (1966).
53. Barker G. K., Hall M. E., Moss K. J., Biochim. Biophys. Acta, 46, 203 (1961).
54. Фриз Э., в кн. «Молекулярная генетика», под ред. Кона В., Дэвидсона Д., Изд. «Мир», 1964, стр. 226.
55. Freese E., J. Mol. Biol., 1, 87 (1959).
56. Litman R. M., Pardee A. B., Biochim. Biophys. Acta 42, 117, 131 (1960).
57. Londos D., Duval J., Aubel-Sadron G., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., 49, 739 (1967).
58. Duval J., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., 47, 787 (1965).
59. Londos-Gagliardi D., Aubel-Sadron G., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., 50, 381 (1968).
60. Wempen I., Doerr I. L., Kaplan L., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., 82, 1624 (1960).
61. Flaks J. G., Cohen S. S., Biochim. Biophys. Acta, 25, 667 (1957).
62. Friedkin M., Fed. Proc., 16, 183 (1957).
63. Blakley R. L., Biochim. Biophys. Acta, 24, 224 (1957).
64. Phear E. A., Greenberg D. M., J. Am. Chem. Soc., 79, 3737 (1957).
65. Cline R. E., Fink R. M., Fink K., J. Am. Chem. Soc., 81, 2521 (1959).
66. Maley F., Arch. Biochem. Biophys., 96, 550 (1962).
67. Alegria A. N., Biochim. Biophys. Acta, 149, 317 (1967).
68. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., Изв. АН СССР, сер. хим., 1966, 1779.
69. Budowsky E. I., Shibaev V. N., Eliseeva G. I., in «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», v. 1, Zorbach W. W., Tipson R. S. (eds), New York — London — Sydnay — Toronto, 1968, p. 436.
70. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1965, стр. 110.
71. Hoffman H. D., Müller W., Biochim. Biophys. Acta, 123, 421 (1966).
72. Moudrianakis E. N., Beer M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 53, 564 (1965).
73. Erickson H., Beer M., Biochemistry, 6, 2694 (1967).
74. Moudrianakis E. N., Beer M., Biochim. Biophys. Acta, 95, 23 (1965).
75. Kriek E., Miller J. A., Juhl U., Miller E. C., Biochemistry, 6, 177 (1967).
76. Kriek E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 20, 793 (1965).

77. Miller E. C., Juhl U., Miller J. A., Science, 153, 1125 (1966).
78. Kriek E., Biochim. Biophys. Acta, 161, 273 (1968).
79. Schweizer M. P., Chan S. I., Helmkamp G. K., Ts'o P. O. P., J. Am. Chem. Soc., 86, 696 (1964).
80. Bullock F. J., Jardetzky O., J. Org. Chem., 29, 1988 (1964).
81. Shelton K. R., Clark J. M., Biochemistry, 6, 2735 (1967).
82. Остерман Л. А., Адлер В. В., Бибилашвили Р. Ш., Вопр. мед. хим., 13, 200 (1967).
83. Chambers R. W., J. Am. Chem. Soc., 90, 2192 (1968).
84. Fink R. M., Arch. Biochem. Biophys., 107, 493 (1964).
85. Fink R. M., J. Biol. Chem., 238, 1764 (1963).
86. Fink R. M., Fink K., J. Biol. Chem., 237, 2889 (1962).
87. Cheong L., Rich M. A., Eidinoff M. L., J. Biol. Chem., 235, 1441 (1960).
88. Shapiro R., Klein R. S., Biochemistry, 6, 3576 (1967).
89. Heller S. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 998 (1968).
90. Остерман Л. А., Адлер В. В., Бибалашвили Р. Ш., Савочкина Л. П., Варшавский Я. М., Биохимия, 31, 398 (1966).
91. Shapiro R., Pohl S. H., Biochemistry, 7, 448 (1968).
92. Cohn W. E., Biochem. J., 64, 28p (1956).
93. Moore A. M., Anderson S. M., Canad. J. Chem., 37, 590 (1959).
94. Wang S. Y., Nature, 180, 91 (1957); J. Org. Chem., 24, 11 (1959).
95. Baudisch O., Davidson D., J. Biol. Chem., 64, 233 (1925); Barszcz D., Trenner S., Shugar D., Acta Biochim. Polon, 10, 9 (1963).
96. Nelson J. A., Ristow S. C., Holley R. W., Biochim. Biophys. Acta, 149, 590 (1967).
97. Ishihara H., Suzuki N., Yokoi H., Nature, 182, 1302 (1958).
98. Jones A S., Woodhouse D. L., Nature, 183, 1603 (1959).
99. Fukuhara T. K., Visser D. W., Biochemistry, 1, 563 (1962).
100. Brady T. G., McEvoy-Bowe T. G., Nature, 168, 299 (1951).
101. Massart L., Hoste J., Biochim. Biophys. Acta, 1, 83 (1947).
102. Caputto R., Leloir L. F., Cardini C. E., Paladini A. C., J. Biol. Chem., 184, 333 (1950).
103. Wang S. Y., Hashagen J. M., J. Mol. Biol., 8, 333 (1964).
104. Yu C. T., Zamecnik P. C., Biochim. Biophys. Acta, 76, 209 (1963).
105. Yu C., Zamecnik P. C., Biochem Biophys. Res. Comm., 12, 457 (1963).
106. Konhgiesser W., Z. Physiol. Chem., 316, 146 (1959).
107. Ганстон Ф. Д., в кн. «Успехи органической химии», под ред. Кнунянца И. Л., т. 1, Издатинлит, 1963, стр. 114.
108. Beer M., Stern S., Carmalt D., Mohlhendrich K. H., Biochemistry, 5, 2283 (1966).
109. Burton K., Riley W. T., Biochem. J., 98, 70 (1966).
110. Howgate P., Jones A. S., Tittensor J. R., J. Chem. Soc., (B), 1968, 275.
111. Highton R., Murr B. L., Shafa F., Beer M., Biochemistry, 7, 825 (1968).
112. Burton K., Varney N. F., Zamecnik P. C., Biochem. J, 99, 29c (1966).
113. Howgate P., Jones A. S., Tittensor J. R., J. Chem. Soc., (C), 1968, 275.
114. Honjo M., Furukawa Y., Nishikawa M., Kamiya K., Yoshioka Y., Chem. Pharm. Bull., 15, 1076 (1967).
115. Bahnister B., Kagan F., J. Am. Chem. Soc., 82, 3363 (1960).
116. Levene P. A., LaForge F. B., Ber., 45, 608 (1912).
117. Burke D. C., J. Org. Chem., 20, 643 (1955).
118. Haavaldsen L., Laland S. C., McKindley-McKee J., Roth E., Biochim. Biophys. Acta, 33, 201 (1959).
119. Laland S. C., Serck-Hanssen G., Biochem. J., 90, 76 (1964).

120. Cohn W. E., Doherty D. G., J. Am. Chem. Soc., 78, 2863 (1956).
121. Green M., Cohen S. S., J. Biol. Chem., 225, 397 (1957).
122. Green M., Cohen S. S., J. Biol. Chem., 228, 601 (1957).
123. Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., 32, 198 (1967).
124. Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., 33, 2470 (1968).
125. Roy-Burman P., Roy-Burman S., Visser D. W., Biochim. Biophys. Acta, 142, 355 (1967).
126. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., Изв. АН СССР, сер. хим., 1965, 914.
127. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., ДАН СССР, 159, 605 (1964).
128. Hanze A. R., J. Am. Chem. Soc., 89, 6720 (1967).
129. Cerutti P., Kondo Y., Landis W. R., Witkop B., J. Am. Chem. Soc, 90, 771 (1968).
130. Cerutti P., Miller N., J. Mol. Biol., 26, 55 (1967).
131. Kondo Y., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., 90, 764 (1968).
132. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon, 7, 309 (1960).
133. Iwasaki H., Yakugaki Zashi, 82, 1368 (1962).
134. Visser D. W., Van Praag D., Fukihara T. K., Arch. Biochem. Biophys., 70, 217 (1957).
135. Cohn W. E., Biochim. Biophys. Acta, 32, 569 (1959).
136. Miller N., Cerutti P. A., J. Am. Chem. Soc., 89, 2767 (1967).
137. Macon J. B., Wolfenden R., Biochemistry, 7, 3453 (1968).
138. Cerutti P., Holt J. W., Miller N., J. Mol. Biol., 34, 505 (1968).
139. Fox J. J., Van Praag D., J. Am. Chem. Soc., 82, 486 (1960).
140. Lee H. J., Wigler R. W., Biochemistry, 7, 1427 (1968).
141. Smith D. L., Elving P. J., J. Am. Chem. Soc., 84, 1412 (1962).
142. Скулачев В. П., Денисович Д. И., Биохимия, 31, 132 (1966).
143. Skulachev V. P., Nature, 198, 444 (1963).
144. Verwoerd D. W., Kohlhage H., Zillig W., Nature, 192, 1038 (1961)
145. Verwoerd D. W., Zillig W., Kohlhage H., Z. physiol. Chem., 332, 184 (1963).
146. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Shibaeva R. P., Biochim. Biophys. Acta, 68, 493 (1963).
147. Budowsky E. I., Shibaeva R. P., Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., J. Mol. Biol. (in press).
148. Матье Ж., Алле А., Принципы органического синтеза, Издатинлит, 1962, стр. 591.
149. Альберт А., Сержент Е., Константы ионизации кислот и оснований, Изд. «Химия», 1964, стр. 147.
150. Brown D. M., Hewlins M. J. E., J. Chem. Soc., (C), 1968, 1922.
151. Будовский Э. И., Шибаева Р. П., Свердлов Е. Д., Монастырская Г. С., Мол. биол., 2, 321 (1968).
152. Lawley P. D., J. Mol. Biol., 24, 75 (1967).
153. Kochetkov N.K., Budowsky E.I., Sverdlov E.D., Shibaev V.N., Shibaeva R. P., Monastyrskaya G. S., Tetrahedron Letters, 1967, 3253.
154. Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Шибаева Р. П., Монастырская Г. С., Кочетков Н. К., Мол. биол., 2, 329 (1968).
155. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 15, 107 (1968)
156. Уланов Б. П., Серебряный А. М., Костяновский Р. Г., ДАН СССР, 176, 474 (1967).
157. Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Shibaeva R. P., Monastyrskaya G. S., Kochetkov N. K., J. Mol. Biol (in press).
158. Будовский Э. И., Симукова Н. А., Шибаева Р. П., Кочетков Н. К., Биохимия, 30, 902 (1965).
159. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 12, 337 (1965).

160. Freese E., Bautz-Freese E., Graham S., Biochim. Biophys. Acta, 123, 17 (1966).
161. Rhaese H. J., Freese E., Biochim. Biophys Acta, 155, 476 (1968).
162. Rhaese H. J., Freese E., Melzer M. S., Biochim. Biophys. Acta, 155, 491 (1968).
163. Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., J. Mol Biol., 44, 205 (1969).
164. Морозова Т. М., Салганик Р. И., Биохимия, 29, 17 (1964).
165. Janion C., Shuhar D., Acta Biochim Polon., 15, 107 (1968).
166. Brown D. M., Phillips J. H., J. Mol. Biol., 11, 663 (1965).
167. Phillips J. H., Brown D. M., Progr. Nucl. Acid Res., 7, 349 (1967).
168. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Progr. Nucl. Acid Res., 9, 403 (1969).
169. Скляднева В. Б., Киселева Н. М., Будовский Э. И., Тихоненко Т. И., Мол. биол., 4, 110 (1970).
170. Lingens F., Schneider-Bernlöhr H., Ann., 686, 134 (1965).
171. Brown D. M., McNaught A. D., Shell P., Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 967 (1966).
172. Patel A. B., Brown H. D., Nature, 214, 402 (1967).
173. Hayatsu H., Takeishi K., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 123, 445 (1966).
174. Hayatsu H., Ukita T., Biochim Biophys. Acta, 123, 458 (1966).
175. Muto A., Miura K., Hayatsu H., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 95, 669 (1965).
176. Kikugawa K., Hayatsu H., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 134, 221 (1967).
177. Kikugawa K., Muto A., Hayatsu H., Miura K., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 134, 232 (1967).
178. Galor L., Mellema J. B., Moudrianakis E. N., Beer M., Biochemistry, 6, 1909 (1967).
179. Frits H. C., Kotter B., Z. Naturforsch., 18b, 124 (1963).
180. Marrian D., Spivcer V., Balis M. E., Brown G. B., J. Biol. Chem., 189, 533 (1951).
181. Davidson J. H., Smelie R. M., Biochem J., 52, 594 (1952).
182. Будовский Э. И., Клебанова Л. М., Вопросы мед. хим., 13, 299 (1967).
183. Jones A. S., Main A. M., Walker R. T., J. Chem. Soc., (C), 1966, 1784
184. Jones A. S., Main A. M., Walker R. T., J. Chem. Soc., (C), 1966, 692.
185. Whitehead C. W., Traverso J. J., J. Am. Chem. Soc., 82, 3971 (1960).
186. Miller N., Fox J. J., J. Org. Chem., 29, 1772 (1964).
187. Johns H. E., LeBlanc J. C., Freeman K. B., J. Mol. Biol., 13, 849 (1965).
188. Freeman K. B., Hariharan P. V., Johns H. E., J. Mol. Biol., 13, 833 (1965).
189. Shuster H., Z. Naturforsch., 19b, 815 (1964).
190. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 14, 293 (1967).
191. Small G. D., Gordin P., J. Mol. Biol., 34, 281 (1968).
192. Werbein A., Valentine R. C., Hidalgo-Salvatierr O., McLaren A. D., Photochem. Photobiol., 7, 253 (1968).
193. Gerster J. F., Jones J. W., Robins R. K., J. Org. Chem., 28, 945 (1963); Ikehara M., Uno H., Ishikawa F., Chem. Pharm. Bull., 12, 267 (1964); Ikehara M., Uno H., Chem. Pharm. Bull., 13, 221 (1965).
194. Zemlicka J., Šorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., 30, 1880, 2052 (1965).
195. Fox J. J., Wempen I., Hampton A., Doerr I. L., J. Am. Chem. Soc., 80, 1669 (1958).
196. Fox J. J., Van Praag D., Wempen I., Doerr I. L., Cheong L., Knoll J. E., Eidinoff M. L., Bendich A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 81, 178 (1959).

197. Lawley P. D., Progr. Nucl. Acid Res., 5, 89 (1966).
198. Wheeler G. P., Cancer Res., 22, 651 (1962).
199 Росс У., Биологические алкилирующие агенты, Медгиз, 1964.
200. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 104, 385 (1934).
201. Miles H. T., Biochim. Biophys. Acta, 22, 247 (1956); J. Am. Chem. Soc., 79, 2565 (1957).
202. Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 491 (1960); 8, 235 (1961).
203. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Изв. АН СССР, сер. хим., 1962, 1035.
204. Haines J. A., Reese C. B., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1964, 1406.
205. Roosevelt T., Fleyscher M. H., Hall R. H., J. Med. Chem., 8, 486 (1965).
206. Friedman O. M., Nahapatra G. N., Dash B., Stevenson R., Biochim. Biophys. Acta, 103, 286 (1965).
207. Brimacombe R. L. C., Griffin B. E., Haines J. A., Haslam W. J., Reese C. B., Biochemistry, 4, 2452 (1965).
208. Шер В., Шугар Д., Биохимия, 26, 840 (1961).
209. Martin D. M. G., Reese C. B., Stephenson G. F., Biochemistry, 7, 1406 (1968).
210. Broom A. D., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 87, 1145 (1965).
211. Khwaja T. A., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 88, 3640 (1966).
212. Gin J B., Dekker C. A., Biochemistry, 7, 1413 (1968).
213. Броуде Н. Е., Будовский Э. И., Кочетков Н. К., Мол. биол., 1, 214 (1967).
214. Haines J. A., Reese C. B., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1962, 5281.
215. Jones J. W., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 85, 193 (1963).
216. Bredereck H., Martini A., Chem. Ber., 80, 401 (1947).
217. Miles H. T., J. Org. Chem., 26, 4761 (1961).
218. Scheit K. H., Holý A., Biochim. Biophys. Acta, 149, 344 (1967).
219. Cohn W. E., J. Biol. Chem., 235, 1488 (1960).
220. Griffin B. E., Haines J. A., Reese C. B., Biochim. Biophys. Acta, 142, 536 (1967).
221. Reese C. B., Sulston J. E., Biochim. Biophys. Acta, 149, 293 (1967).
222. Holý A., Scheit K. H., Biochim. Biophys. Acta, 123, 430 (1966); 138, 230 (1967).
223. Kriek E., Emmelot P., Biochemistry, 2, 733 (1963).
224. Kriek E., Emmelot P., Biochim. Biophys. Acta, 91, 59 (1964).
225. Magee P. N., Farber E., Biochem. J., 83, 114 (1963); Lawley P. D., Brookes P., Magee P. N., Craddock V. M., Swann P. F. Biochim. Biophys. Acta, 157, 646 (1968); Swann P. F., Magee P. N., Biochem. J., 110, 39 (1968).
226. Terakawi A., Greenberg J., Biochim. Biophys. Acta, 95, 170 (1965).
227. Lingens F., Oltmanns O., Z. Naturforsch., 21b, 660 (1966).
228. Chandra P., Wacker A., Süssmuth R., Lingens F., Z. Naturforsch., 22b, 512 (1967).
229. Zamenhof S., Heldenmuth L. H., Zamenhof P. J., Proc. Nat. Acad. Sci US, 55, 50 (1966).
230. Craddock V. M., Biochem. J., 106, 921 (1968).
231. Schoental R., Biochem. J., 102, 5c (1967).
232. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 58, 234 (1967).
233. Magee P. N., Lee K. Y., Biochem. J., 91, 35 (1964).
234. McCalla D. R., Biochim. Biophys. Acta, 155, 114 (1968).
235. Rau J., Lingens F., Naturwiss., 54, 517 (1967).
236 Lingens F., Rau J., Süssmuth R., Z. Naturforsch., 23b, 1565 (1968).
237. Lawley P. D., Nature, 218, 580 (1968).
238. Bredereck H., Haas H., Martini A., Chem. Ber., 81, 307 (1948).

239. Broom A. D., Townsend L. B., Jones J. W., Robins R. K., Biochemistry, **3**, 494 (1964).
240. Pochon F., Michelson A. M., Biochim. Biophys. Acta, **145**, 321 (1967).
241. Wacker A., Ebert M., Z. Naturforsch., **14b**, 709 (1959).
242. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1960**, 539.
243. Coddington A., Biochim. Biophys. Acta, **59**, 472 (1962).
244. Lawley P. D., Brookes P., Biochem. J., **89**, 127 (1963).
245. Lawley P. D., Brookes P., Biochem. J., **92**, 19c (1964).
246. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1962**, 1348.
247. Pochon F., Michelson A. M., Biochim. Biophys. Acta, **149**, 99 (1967)
248. Ludlum D. B., Mol. Pharmacol., **2**, 585 (1966).
249. Furuhawa Y., Kobayashi K., Kanai K., Honjo M., Chem. Pharm. Bull., **13**, 1273 (1965).
250. Hoffer M., Chem. Ber., **93**, 2777 (1960).
251. Michelson A. M., Pochon F., Biochim. Biophys. Acta, **114**, 469 (1966).
252. Griffin B. E., Reese C. B., Biochim. Biophys. Acta, **68**, 185 (1963).
253. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Спиридонова С. М., ХПС, **1968**, 123.
254. Michelson A. M., Grunberg-Manago M., Biochim. Biophys. Acta, **91**, 92 (1964).
255. Ludlum D. B., Warner R. C., Wahba A. J., Science, **145**, 397 (1964).
256. Lawley P. D., Brookes P., Biochem. J., **89**, 127 (1963).
257. Bollack C., Keith G., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., **47**, 765 (1965).
258. Ludlum D. B., Biochim. Biophys. Acta, **119**, 630 (1966).
259. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1961**, 3923.
260. Brookes P., Dipple A., Lawley P. D., J. Chem. Soc., (C), **1968**, 2026.
261. Imura N., Tsuruo T., Ukita T., Chem. Pharm. Bull., **16**, 1105 (1968).
262. Clark V. M., Todd A. R., Zussman J., J. Chem. Soc., **1951**, 2952.
263. Holmes R. E., Robins R. K., J. Org. Chem., **28**, 3483 (1963).
264. Windmueller H. G., Kaplan N. O., Biochim. Biophys. Acta, **61**, 307 (1962).
265. Windmueller H. G., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., **236**, 2716 (1961).
266. Ukita T., Okuyama H., Hayatsu H., Chem. Pharm. Bull., **11**, 1399 (1963).
267. Mizuno H., Okuyama H., Hayatsu H., Ukita T., Chem. Pharm. Bull., **12**, 1240 (1964).
268. Fraenkel-Conrat H., Biochim. Biophys. Acta, **49**, 169 (1961).
269. Roberts J. J., Warwick G. P., Biochem. Pharmac., **12**, 1441 (1963).
270. Colburn N. H., Richardson R. G., Boutwell R. K., Biochem. Pharmac., **14**, 1113 (1965).
271. Baugh C. M., Shaw E. N., Biochim. Biophys. Acta, **114**, 213 (1966).
272. Lawley P. D., Brookes P., J. Mol. Biol., **25**, 143 (1967).
273. Lorkiewicz Z., Shybalski W., J. Bacteriol., **82**, 195 (1961).
274. Brookes P., Lawley P. D., Biochem. J., **77**, 478 (1960).
275. Brookes P., Lawley P. D., Biochem. J., **80**, 496 (1961).
276. Price C. C., Gaucher G. M., Koneru P., Shibakawa R., Sowa J. R., Yamaguchi M., Biochim. Biophys. Acta, **166**, 327 (1968).
277. Уланов Б. П., Малышева Л. Ф., Биофизика, **12**, 235 (1967).
278. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I., Tetrahedron Letters, **1967**, 3557.
279. Беликова А. М., Гринева Н. И., Изв. Сиб. отд.. АН СССР, сер. хим., № 11, 79 (1966).
280. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., ЖОХ, **40**, 215 (1970)
281. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим., № 5, 125 (1968).
282. Зарытова В. Ф., Соколова Н. И., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Шабарова З. А., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим., № 6, 101 (1968)
283. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Мол. биол., **3**, 210 (1969).

284. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Теплова Н. М., Мол. биол., 4, 30 (1970).
285. Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Сенженко Л. П., Теплова Н. М., Мол. биол. 4, 307 (1970).
286. Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Мол. биол., 4, 201 (1970).
287. Doskočil J., Šormova Z., Coll. Czech. Chem. Comm., 30, 481 (1965).
288. Doskočil J., Šormova Z., Coll. Czech. Chem. Comm., 30, 492 (1965).
289. Kohn K. W., Spears C. L., Biochim. Biophys. Acta, 145, 734 (1967).
290. Lawley P. D., Brookes P., J. Mol. Biol., 25, 143 (1967).
291. Kohn K. W., Spears C. L., Doty P., J. Mol. Biol., 19, 266 (1966).
292. Chambers R. W., Biochemistry, 4, 219 (1965).
293. Yoshida M., Ukita T., J. Biochem., 57, 818 (1965).
294. Yoshida M., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 157, 455 (1968).
295. Ofengand J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 192 (1965); J. Biol. Chem., 242, 5034 (1967).
296. Rake A. V., Tener G. M., Biochemistry, 5, 3992 (1966).
297. Yoshida M., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 157, 466 (1968).
298. Yoshida M., Kaziro Y., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 166, 646 (1968).
299. Yoshida M., Furuichi Y., Kaziro Y., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, 166, 636 (1968).
300. Jones A. S., Tittensor J. R., Tetrahedron Letters, 1968, 3071.
301. Gilham P. T., J. Am. Chem. Soc., 84, 687 (1962).
302. Ho N. W. Y., Gilham P. T., Biochemistry, 6, 3632 (1967).
303. Гиршович А. С., Шубина Т. Н., Мол. биол., 3, 235 (1969).
304. Гиршович А. С., Грачев М. А., Обухова Л. В., Мол. биол., 2 351 (1968).
305. Naylor R., Ho N. W. Y., Gilham P. T., J. Am. Chem Soc., 87, 4209 (1965).
306. Кнорре Д. Г., Малыгин Э. Г., Мушинская Г. С., Фаворов В. В., Биохимия, 31, 334 (1966).
307. Naylor R., Gilham P. T., Biochemistry, 5, 2722 (1966).
308. Augustini-Tocco G., Brown G. L., Nature, 206, 683 (1965).
309. Brostoff S. W., Ingram V. M., Science, 158, 666 (1967).
310. Lee J. C., Ho N. W. Y., Gilham P. T., Biochim. Biophys. Acta, 95, 503 (1965).
311. Иванова О. И., Кнорре Д. Г., Малыгин Э. Г., Мол. биол., 1, 335 (1967).
312. Древич В. Ф., Кнорре Д. Г., Малыгин Э. Г., Салганик Р. И., Мол. биол., 1, 249 (1967).
313. Lohrmann R., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 86, 4188 (1964).
314. Brown D. M., Todd A. R., Varadarajan S., J. Chem. Soc., 1956, 2384.
315. Bentley H. R., Cunningham K. G., Spring F. S., J. Chem. Soc., 1951, 2301.
316. Weygand F., Wirth H., Chem. Ber., 85, 1000 (1952).
317. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 3821 (1963).
318. Aylward N. N., J. Chem. Soc., (B), 1966, 627.
319. Eyring E. J., Ofengand J., Biochemistry, 6, 2500 (1967).
320. Lewin S., Experientia, 20, 666 (1964).
321. Stevens M. A., Magrath D. I., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 80, 2755 (1958).
322. Stevens M. A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 80, 2759 (1958)
323. Stevens M. A., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 81, 1734 (1959).
324. McCormick D. B., Biochemistry, 5, 746 (1966).
325. Klenow H., Frederiksen S., Biochim. Biophys. Acta, 52, 384 (1961)

326. Cramer F., Randerath K., Schäfer E. A., Biochim. Biophys. Acta, 72, 150 (1963).
327. Cramer F., Seidel H., Biochim. Biophys. Acta, 72, 157 (1963).
328. Delia T. J., Olsen M. J., Brown G. B., J. Org. Chem., 30, 2766 (1965).
329. Subbaraman L. R., Subbaraman J., Behrman E. J., Chem. Comm., 1968, 1024; Subbaraman L. R., Subbaraman J., Behrman E. J., Biochemistry, 8, 3059 (1969).
330. Delia T. J., Brown G. B., J. Org. Chem., 31, 178 (1966).
331. Seidel H., Biochim. Biophys. Acta, 138, 98 (1967).
332. Sigel H., Brintzinger H., Helv. Chim. Acta, 48, 433 (1965).
333. Parham J. C., Fissekis J., Brown G. B., J. Org. Chem., 31, 966 (1966).
334. Stevens M. A., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 82, 3189 (1960).
335. Cramer F., Seidel H., Biochim. Biophys. Acta, 91, 14 (1964).
336. Seidel H., Cramer F., Biochim. Biophys. Acta, 108, 367 (1965).
337. Cramer F., Erdmann V. A., Nature, 218, 92 (1968).
338. Rhaese H. J., Biochim. Biophys. Acta, 166, 311 (1968).
339. Long R. A., Robins R. K., Townsend L. B., J. Org. Chem., 32, 2751 (1967).
340. Ikehara M., Tazawa I., Fukui T., Chem. Pharm. Bull., 17, 1019 (1969).
341. Ikehara M., Uesugi S., Chem. Pharm. Bull., 17, 348 (1969).
342. Fritzsche H., Biochim. Biophys. Acta, 149, 173 (1967).
343. Maslova R. N., Lesnik E. A., Varshawsky Ya. M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 34, 260 (1969).
344. Maslova R. N., Lesnik E. A., Varshawsky Ya. M., FEBS Letters, 3, 211 (1969).
345. Shelton K. R., Clark J. M. jr., Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 851 (1968)
346. Di Giamberardino L., Koller T., Beer M., Biochem. Biophys. Acta, 182, 523 (1969).
347. Hayatsu H., Iida S., Tetrahedron Letters, 1969, 1031.
348. Kanaoka Y., Sato E., Aira M., Yonemitsu S., Mizuno Y., Tetrahedron Letters, 1969, 3361.
349. Klötzer W., Herberz M., Monatsh., 96, 1731 (1965).
350. Klötzer W., Monatsh., 97, 1117 (1966).
351. Broom A. D., Robins R. K., J. Org. Chem., 34, 1025 (1969).
352. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Greenberg J., Michelson A. M., Science, 160, 1235 (1968).
353. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, 8, 3260 (1969).
354. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, 8, 3269 (1969).
355. Бедняк А. Е., Сизова С. Т., в сб. «Специфичность химического мутагенеза», Изд. «Наука», 1968, стр. 20.
356. Černa J., Rychlik I., Šorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., 31, 366 (1966).
357. Захарян Р. А., Венкстерн Т. В., Баев А. А., Биохимия, 32, 1068 (1967).
358. Bollack C., Dirheimer G., Ebel J. P., Abstr. 6th Meet. of FEBS, Madrid, 1969, p. 59.
359. Bollack C., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., 50, 2351 (1968).
360. Lawley P. D., Lethbridge J. H., Edwards P. A., Shooter K. V., J. Mol. Biol., 39, 181 (1969).
361. Lee J. C., Ingram V. M., J. Mol. Biol., 41, 431 (1969).
362. Meltz D. H., Brown G. L., Biochemistry, 8, 2312, 2329 (1969).
363. Gangloff J., Ebel J. P., Bull. Soc. chim. biol., 50, 2335 (1968).
364. Cramer F., Doepner H., Haar F., Schlimme E., Seidel H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 61, 1384 (1968).
365. Burton K., Biochem. J., 104, 686 (1967).

РЕАКЦИИ ЭКЗОЦИКЛИЧЕСКИХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

I. ВВЕДЕНИЕ

Для понимания вопросов реакционной способности и химической модификации нуклеиновых кислот важное значение имеют реакции, в которых участвуют экзоциклические заместители пуриновых и пиримидиновых оснований, т. е. аминогруппы цитозина, аденина или гуанина, карбонильные группы урацила, гуанина, ксантина и их производных, а также реакции атома серы тиопроизводных (редких компонентов РНК). Как уже отмечалось выше (см. гл. 3), *n*-электроны атомов азота аминогрупп и кислорода карбонильных групп оснований нуклеиновых кислот (и их производных) в значительной степени взаимодействуют с π-электронной системой гетероциклического кольца, вследствие чего свойства соответствующих компонентов нуклеиновых кислот сильно отличаются от свойств простых аминов, амидов или тиоамидов.

II. РЕАКЦИЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ПО АТОМУ АЗОТА ЭКЗОЦИКЛИЧЕСКОЙ АМИНОГРУППЫ

Экзоциклические аминогруппы пуриновых и пиримидиновых оснований, как упоминалось выше (см. стр. 153), при образовании сопряженной системы отдают в нее два π-электрона и приобретают вследствие этого частичный положительный заряд. Однако учет σ-электронной плотности (см. стр. 155) показывает, что суммарный заряд на атомах азота экзоциклических аминогрупп оснований (и их производных) будет все же отрицательным, и, таким образом, становится возможной атака электрофильных реагентов по этим центрам. К числу подобных реакций относится взаимодействие нуклеозидов и нуклеотидов с активированными производными карбоновых кислот (например, с ангидридами, хлорангид-

26 Зак. 614

ридами и т. д.), активными альдегидами и другими соединениями с частичным положительным зарядом на атоме углерода (например, с диалкоксиаминометанами — ацеталями диметилформамида). Электрофильными агентами, вступающими в реакцию по аминогруппе нуклеозидов, могут служить также азотсодержащие соединения, например соли диазония. Достаточно легко атакует аминогруппу в нуклеозидах и катион нитрозония — активный компонент, присутствующий в смеси нитрита и кислоты. Однако промежуточно образующееся диазосоединение в этом случае (в отличие от ароматических аминов) не может стабилизоваться за счет подачи электронов от ядра, вследствие чего оно крайне легко разлагается и конечным результатом реакции, как и в случае алифатических аминов, является дезаминирование исходного соединения.

По своему химическому поведению аминогруппа в компонентах нуклеиновых кислот наиболее близка, по-видимому, к аминогруппе ароматических аминов, содержащих сильные электроноакцепторные заместители, например к аминогруппе *п*-нитроанилина. Дополнительное осложнение состоит здесь, однако, в том, что даже простейшие производные данного ряда (нуклеозиды) содержат также и другие функциональные группы, способные вступать в реакцию с электрофильными реагентами. Это атомы азота пиридинового типа в гетероциклическом ядре, гидроксильные группы остатка моносахарида. При переходе от нуклеозида к нуклеотиду проведение реакции осложняется еще больше: за счет появления в молекуле функциональной группы с сильными нуклеофильными свойствами — остатка фосфорной кислоты — создается возможность новых побочных реакций. При реакциях с олиго- и полинуклеотидами вследствие таких побочных реакций могут возникать тризамещенные производные фосфорной кислоты, в которых крайне облегчена атака нуклеофильных агентов на атом фосфора, что может приводить к расщеплению полимерной цепи. Поэтому подбор оптимальных условий проведения реакции по экзоциклическим заместителям ядер на полинуклеотиде является обычно достаточно трудной задачей.

1. N-Ацилирование

Из трех основных нуклеозидов РНК, содержащих аминогруппы, легче всего вступает в реакции ацилирования цитидин. Специфическое ацилирование аминогруппы в цитидине без затрагивания гидроксильных групп остатка рибозы и атома азота N-3 может быть достигнуто при обработке нуклеозида ограниченным количеством ацилирующего агента.

Впервые избирательное N-ацилирование экзоциклической аминогруппы было осуществлено на примере цитидин-2′,3′-циклофос-

фата действием уксусного ангидрида в смеси диоксан — диметилформамид в присутствии три-*н*-бутиламина [1].

$\xrightarrow{Ac_2O}$

В дальнейшем оказалось, что селективное ацетилирование аминогрупп может быть проведено и при действии уксусного ангидрида в пиридине [2]. Был предложен целый ряд специфических ацилирующих агентов: тиоуксусная кислота [3] и N-ацетокси-1,2-дигидрохинолинон-2 [4] — для избирательного N-ацетилирования цитидина; N-бензоилимидазол [5], бензазид [6] и N-бензоилоксисукцинимид [7] — для N-бензоилирования цитидина. Однако наиболее удобным и общим методом селективного N-ацилирования цитидина и 2′-дезоксицитидина по аминогруппе является недавно разработанный метод [8, 9], состоящий в постепенном добавлении ангидрида кислоты к кипящему спиртовому раствору нуклеозида; N-ацильные производные образуются при этом с выходом 80—90%.

Расположение ацильной группы у экзоциклического атома азота подтверждается физико-химическими свойствами N-ацетилцитидина [10, 11]. ИК-Спектры и спектры ЯМР однозначно показывают отсутствие в продукте реакции свободной NH_2-группы и связь ацетильной группы с экзоциклическим заместителем, а не с азотом цикла. В УФ-спектре наблюдается характерный длинноволновый максимум в области 300 *ммк*. В ряду производных цитозина структура подтверждена и химическим методом [12]: при кислотном гидролизе 4-*экзо*-N-бензоилцитозина наряду с цитозином и урацилом был идентифицирован бензамид:

$\xrightarrow{80\%\text{-ная } CH_3COOH}$ $+ C_6H_5CONH_2$

При ацилировании цитидина в более жестких условиях протекают и другие реакции. Так, при взаимодействии цитидина с бензоилхлоридом в пиридине[12] при комнатной температуре можно получить 4-*экзо*-N,2′,3′,5′-тетрабензоилцитидин I, а при 100° C — пентаацилированное производное II:

II

I

III

Соединение II легко переходит[12] в тетрапроизводное I; при мягкой щелочной обработке последнего удается получить[13] 4-*экзо*-N-бензоилцитидин III. Бензоильная группа в соединении III отщепляется при более жесткой щелочной обработке.

Такой подход — полное ацилирование нуклеозида и последующее избирательное O-деацилирование — широко применяется в настоящее время для получения N-ацильных производных нуклеозидов и нуклеотидов, используемых в синтезе олигонуклеотидов (см. гл. 1). Различие в скорости отщепления O- и N-ацильных групп в нуклеозидах увеличивается при переходе от ацетатов к бензоатам и далее к производным *n*-метоксибензойной (анисовой) кислоты параллельно уменьшению скорости деацилирования. Поэтому наиболее часто в синтезе олигонуклеотидов используется N-(*n*-ани-

зоил)-2′-дезоксицитидин IV, который может быть получен с наиболее высоким выходом[14].

IV

V
а (R = BzO)
б (R = H)

VI
а (R = OH)
б (R = H)

Избирательное деацилирование полностью ацилированных производных аденозина и гуанозина является единственно доступным методом получения N-ацильных производных этих нуклеозидов, так как при частичном ацилировании всегда образуются и O-ацильные производные. Исчерпывающее бензоилирование аденозина и 2′-дезоксиаденозина действием бензоилхлорида приводит соответственно к пента-Va[15, 16] или тетрабензоилпроизводному Vб[14]; при обработке этих соединений аммиаком получают 6-*экзо*-N-бензоиладенозинVIa[17, 18] или 6-*экзо*-N-бензоил-2′-дезоксиаденозинVIб[14]. Структура образующихся производных строго не доказана; она была принята по аналогии со структурой соответствующих производных цитидина.

Еще менее определенные данные имеются о структуре N-ацилированных производных гуанозина. Считается, что в известных соединениях этого ряда — N,2′,3′-триацетилгуанозине[19] и N,2′,5′-трибензоилгуанозине[20] ацильная группа связана с аминогруппой при C-2, хотя данное предположение, по существу, не доказано*.

Как и следовало ожидать, N-ацильные производные нуклеозидов заметно отличаются по своему химическому поведению от обычных амидов кислот. Выше уже отмечалось, что они достаточно легко расщепляются в щелочной среде, причем действие аммиака или метиламина намного эффективнее, чем действие щелочи. Легкость расщепления уменьшается при переходе от производных цитидина к производным аденозина и особенно гуанозина; в последнем случае количественного деацилирования удается добиться только в случае ацетильных, но не бензоильных производных. Расщепление N-ацильных связей может происходить также

---

* Структура 2-*экзо*-N-ацилгуанинов недавно была доказана встречным синтезом[137] из продуктов конденсации гуанина с α-дикарбонильными соединениями (см. стр. 413) и последующим восстановлением до 2-*экзо*-N-алкилгуанинов.

под действием гидроксиламина с образованием соответствующих гидроксамовых кислот, как это было показано на примере аминокислотных производных дезоксицитидина[21].

Аналогичная реакция происходит и при действии гидразина. При этом удалось подобрать условия [0,5 *M* раствор гидразина в смеси пиридин — уксусная кислота (4 : 1), 14 *ч* при $\sim 20°$ C], в которых 4-*экзо*-N,3′, 5′-трибензоилдезоксицитидин и тетрабензоилдезоксиаденозин гладко превращаются в 3′,5′-ди-O-бензоилдезоксицитидин и 3′,5′-ди-O-бензоилдезоксиаденозин[22]; для N-ацетилдезоксигуанозина N-деацилирования в этих условиях не происходит.

При обработке *экзо*-N-ацильных производных цитозина и цитидина кислотой деацилирование сопровождается дезаминированием с отщеплением амида кислоты. Так, из N-ацетилцитозина образуются урацил и цитозин в соотношении 1 : 1, а из N-бензоилцитозина — в соотношении 33 : 1[12]. В ряду производных нуклеозидов степень дезаминирования несколько меньше[23].

Другая необычная реакция *экзо*-N-ацильных производных нуклеозидов — легкое расщепление в них N-гликозидной связи, которое может происходить как при мягкой кислотной, так и при щелочной обработке. Эта реакция, так же как и дезаминирование N-ацильных производных нуклеозидов, становится более заметной с увеличением электронодонорных свойств радикала кислоты. Так, получить 6-*экзо*-N-анизоилдезоксиаденозин по схеме, аналогичной использованной для синтеза 6-*экзо*-N-бензоилдезоксиаденозина, не удалось из-за расщепления N-гликозидной связи[14].

В связи с изучением проблемы взаимодействия нуклеиновых кислот с белками значительное внимание было уделено получению N-аминоацильных и пептидных производных нуклеозидов. Как и в случае простых ацильных производных, избирательной реакции по аминогруппе удается добиться только в случае цитидина[24] и его производных[21, 25, 26]. Для этой цели может быть использовано взаимодействие нуклеозида со смешанным ангидридом защищенной аминокислоты:

$Z = C_6H_5CH_2OCO—$
R — остаток рибозы
R′ — алкильная или арильная группа

Более удобным оказался метод, основанный на реакции N-карбобензоксиаминокислоты с нуклеозидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида. В диоксане или тетрагидрофуране происходит избирательное N-аминоацилирование; в абсолютном пиридине — O-аминоацилирование по гидроксильным группам остатка сахара (см. гл. 9).

Получение аминоацильных производных аденозина и 9-(β-*D*-глюкопиранозил)-гуанина удалось осуществить лишь с помощью хлорангидридов N-фталоиламинокислот в довольно жестких условиях[27]; реакция сопровождается ацилированием незамещенных гидроксильных групп в остатке моносахарида. 6-*экзо*-N-Глициладенин был синтезирован взаимодействием аденина с *n*-нитрофениловым эфиром N-карбобензоксиглицина и последующем удалением защитных групп[28], в водных растворах он крайне легко перегруппировывается в N-(пуринил-6)-глицин (см. стр. 454).

Экзоциклические аминогруппы в нуклеозидах могут подвергаться и фосфорилированию под действием фосфорилирующих агентов. Образующиеся при этом фосфоамиды не были охарактеризованы, а лишь обнаружены с помощью хроматографических методов. При фосфорилировании в стандартных условиях 2′,3′-O-защищенных производных рибонуклеозидов при действии 2-цианэтилфосфата и дициклогексилкарбодиимида[29] в случае цитидина N-фосфорилированные производные образуются с выходом 45%, в случае аденозина выход составляет 20% и в случае гуанозина 10%. Возможность протекания такой реакции заставляет использовать при синтезе олигонуклеотидов защищенные по аминогруппе производные нуклеозидов и нуклеотидов. В отличие от обычных фосфоамидов продукты N-фосфорилирования нуклеозидов легко расщепляются при действии аммиака.

Ацилирование аминогруппы гетероциклического ядра может быть гладко осуществлено и для нуклеотидов. При этом первичным местом атаки ацилирующего агента является кислород фосфатной группы. Образующийся смешанный ангидрид типа VII мало устойчив и легко расщепляется при обработке водным пиридином:

$$\underset{\text{VII}}{RO-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}-OAc} \longrightarrow RO-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}-OH + AcOH$$

R — остаток нуклеозида

Исчерпывающее ацилирование нуклеотидов и последующее расщепление O-ацильных производных оказалось наиболее удобным методом синтеза N-ацилированных нуклеотидов. Такой путь был использован для получения производных ряда дезоксирибонуклео-

зид-5'-фосфатов[23, 30, 31, 138] и рибонуклеозид-3'-фосфатов[13, 19, 32]. Аналогичный подход пригоден и для получения N-ацилированных рибодинуклеозидфосфатов[33, 34].

Избирательное ацилирование остатка цитидина удается провести и в полинуклеотидах. При обработке водного раствора полицитидиловой кислоты смесью уксусного ангидрида и трибутиламина получен полимер, содержащий 25—28% остатков 4-*экзо*-N-ацетилцитидина[35]; он сохраняет высокий молекулярный вес и полностью гидролизуется панкреатической пиримидил-РНК-азой, что указывает на отсутствие изомеризации межнуклеотидной связи. Подобным же путем было проведено ацетилирование сополимеров уридиловой и цитидиловой кислот[35]. Действие тиоуксусной кислоты и трибутиламина на раствор цетавлоновой соли суммарной РНК в диметилформамиде дает полимер, в котором ацетилировано до 60% остатков цитидина[11]; при этом не происходит ацетилирования других гетероциклических оснований (кроме цитозина) или гидроксильных групп остатков рибозы. Специфического ацетилирования остатков цитидина в транспортной и рибосомальной РНК удается добиться также при действии уксусного ангидрида в диметилформамиде[139]. Такого рода химическая модификация РНК может быть, очевидно, использована для различных функциональных исследований прежде всего для выяснения значения остатка 4-*экзо*-N-ацетилцитидина в составе тРНК, редким компонентом которой он является (см. стр. 53). Подобные исследования, однако, пока не описаны. Показано, что ацилирование аминогруппы цитидина приводит к уменьшению способности поли-С и поли-(С,U) вызывать включение аминокислот в бесклеточной системе синтеза белка[35].

Как уже отмечалось, производные 4-*экзо*-N-ацетилцитидина способны расщепляться панкреатической пиримидил-РНК-азой. Напротив, олигонуклеотиды, содержащие N-ацилированные остатки гуанозина, не являются субстратами для гуанил-РНК-азы T_1[20]. В принципе ацетилирование РНК по остаткам гуанозина могло бы быть полезным при исследовании первичной структуры РНК. Однако методов для решения этой задачи в настоящее время не разработано.

2. Взаимодействие с альдегидами

Пониженная способность аминогруппы гетероциклических оснований нуклеиновых кислот и их производных подвергаться электрофильной атаке приводит к тому, что эти вещества могут вступать в реакцию только с наиболее активными карбонильными соединениями. Уже в 1954 г. при изучении инактивации вируса табачной мозаики было обнаружено, что РНК этого вируса, а также нуклеозиды и нуклеотиды, содержащие экзоциклические аминогруп-

пы, претерпевают характерные изменения УФ-спектра при обработке растворами формальдегида[36]. Ранее уже упоминалось (см. гл. 5) способность формальдегида оксиметилировать NH-группы гетероциклического ядра и в более жестких условиях вступать в реакцию по C-5 пиримидиновых ядер. В данной главе речь идет о взаимодействии формальдегида с экзоциклической аминогруппой гетероциклических оснований.

Эта реакция быстро протекает в разбавленных водных растворах аденозина, цитидина, гуанозина и их производных; она сопровождается изменением УФ-спектров (рис. 6.1) и понижением pH реакционной смеси. Продукты реакции неустойчивы и легко разлагаются при удалении избытка формальдегида; их не удалось

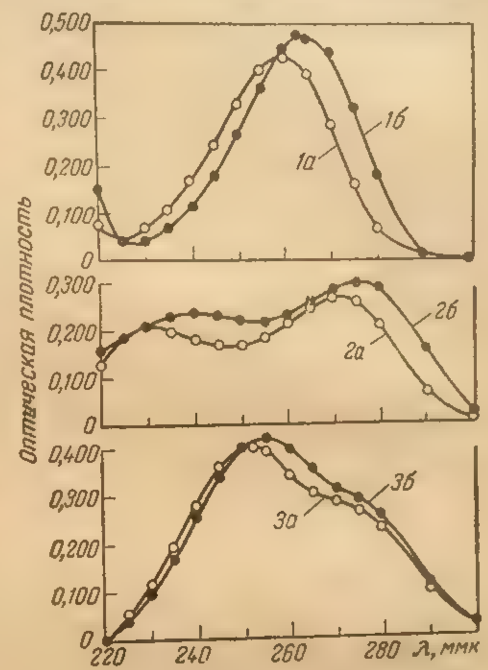


Рис. 6.1. УФ-Спектры дезоксинуклеозид-5′-фосфатов до (*а*) и после их обработки формальдегидом (*б*)[39]:

1 — кривая поглощения дезоксиаденозин-5′-фосфата; *2* — дезоксицитидин-5′-фосфата; *3* — дезоксигуанозин-5′-фосфата; концентрация нуклеотидов в каждом случае $2{,}88 \cdot 10^{-5}$ *М*, концентрация формальдегида 0,91*М*; 0,11*М* фосфатный буфер; pH 6,8.

выделить в индивидуальном состоянии, и строение их однозначно не доказано. На основании ряда косвенных данных[35, 37–39] можно заключить, однако, что при реакции нуклеозидов с формальдегидом в качестве первичных продуктов наиболее вероятно образование N-метилольных производных типа VIII:

$$CH_2O + R\text{—}NH_2 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \underset{\text{VIII}}{R\text{—}NHCH_2OH} \qquad \underset{\text{IX}}{R\text{—}N{=}CH_2}$$

$R\text{—}NH_2$ — нуклеозид

Нельзя, однако, однозначно исключить из рассмотрения структуры типа оснований Шиффа IX, хотя образование подобных соединений в применяемых условиях реакции (разбавленные водные растворы) кажется маловероятным.

Из основных компонентов РНК труднее всего вступают в реакцию с формальдегидом аденозин и его производные. Реакционноспособность цитидина и гуанозина, а также их соответствующих производных близка, хотя гуанозин и его производные реагируют несколько быстрее. При переходе от рибонуклеотидов к дезокси-

рибонуклеотидам реакционная способность производных дезоксигуанозина резко уменьшается и становится близкой к производным дезоксиаденозина.

Кинетика реакции нуклеотидов с формальдегидом хорошо описывается уравнением реакции первого порядка, достигающей равновесия [40]; значения констант скоростей прямой (k_1) и обратной

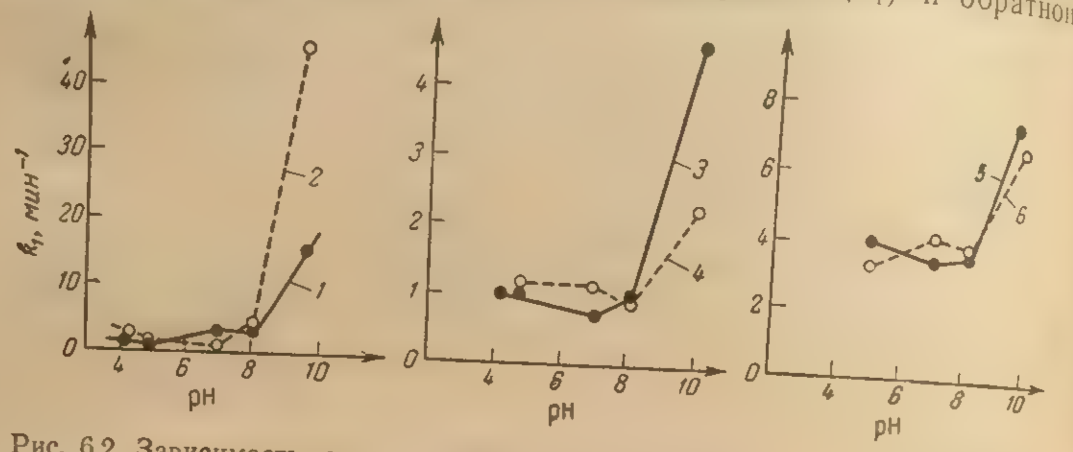


Рис. 6.2. Зависимость скорости реакции нуклеотидов с формальдегидом от pH [40]:

1 — реакция гуанозин-5′-фосфата; 2 — дезоксигуанозин-5′-фосфата; 3 — аденозин-5′-фосфата; 4 — дезоксиаденозин-5′-фосфата; 5 — цитидин-5′-фосфата; 6 — дезоксицитидин-5′-фосфата; 1%-ный раствор формальдегида.

(k_{-1}) реакций, а также констант равновесия K приведены в табл. 6.1. Константа скорости псевдопервого порядка для прямой реакции линейно зависит от концентрации формальдегида.

Таблица 6.1. **Константы скорости прямой и обратной реакций и константы равновесия взаимодействия нуклеозид-5′-фосфатов с формальдегидом**

Спектрофотометрический контроль реакции; концентрация нуклеотидов $5 \cdot 10^{-4}$ *М*; концентрация формальдегида 0,333 *М* (1%); 0,1 *М* фосфатный буфер; pH 7,05; 25°С

Нуклеотид	$k_1 \cdot 10^2$, мин$^{-1}$	$k_{-1} \cdot 10^3$, мин$^{-1}$	$K = \frac{k_1}{k_{-1}}$
Аденозин-5′-фосфат	0,585	0,51	11,4
Цитидин-5′-фосфат	3,04	1,83	16,6
Гуанозин-5′-фосфат *	3,50	6,60	5,3
Дезоксиаденозин-5′-фосфат	1,20	1,06	11,3
Дезоксицитидин-5′-фосфат	4,20	2,71	15,5
Дезоксигуанозин-5′-фосфат	1,30	0,29	45,0

* По данным[39], полученным в близких условиях, реакционная способность дезоксигуанозин-5′-фосфата заметно выше; отношение констант скоростей для реакций дезоксицитидин-5′-фосфата, дезоксигуанозин-5′-фосфата и дезоксиаденозин-5′-фосфата составляет 5 : 2 : 1.

Скорость реакции нуклеотидов с формальдегидом сильно зависит от pH [40] (рис. 6.2): она быстро увеличивается при pH выше 8,

что указывает на существование основного катализа. В реакцию вступают главным образом непротонированные формы оснований в составе нуклеозидов и нуклеотидов. В случае цитидина и дезоксицитидина показана, однако, возможность участия в реакции и протонированных форм нуклеозидов[38], причем константы равновесия для протонированных форм приблизительно в 10 раз меньше, чем для нейтральных форм. При изменении температуры скорость реакции различных нуклеотидов с формальдегидом изменяется примерно одинаково. Для дезоксинуклеозид-5′-фосфатов значение энергии активации найдено равным приблизительно 16,8 *ккал/моль*[39]. Изменение ионной силы среды мало влияет на скорость реакции.

При продолжительной обработке нуклеозидов и нуклеотидов формальдегидом протекает следующая стадия реакции конденсации с образованием бис-(нуклеозидил)-или соответственно бис-(нуклеотидил)-метиленовых производных[41]. Строение этих соединений специально не доказывалось и по аналогии с первичной реакцией нуклеозидов с формальдегидом предполагается, что метиленовое звено соединяет аминогруппы двух остатков нуклеозидов с образованием соединений типа X:

$$\underset{}{R{-}NH_2} + \underset{\text{VIII}}{RNH{-}CH_2OH} \longrightarrow \underset{\text{X}}{R{-}NH{-}CH_2{-}NH{-}R}$$

$R{-}NH_2$ — нуклеозид или нуклеотид

Подобные бис-метиленовые производные устойчивы и могут быть выделены из реакционной смеси. Впервые их образование было показано на примере реакции формальдегида с аденозином[41]; в дальнейшем аналогичные соединения были получены исходя из аденозин-2′(3′)-фосфата[42, 43] и гуанозин-2′(3′)-фосфата. При взаимодействии формальдегида со смесью аденозин-2′(3′)-фосфата и гуанозин-2′(3′)-фосфата удалось получить несимметричное производное типа X, содержащее остатки аденозина и гуанозина[43]. Все эти бис-(нуклеотидил)-метиленовые производные были выделены также из продуктов щелочного гидролиза РНК, обработанной формальдегидом[43, 44].

Рассматриваемая реакция протекает очень медленно по сравнению с образованием N-метилольных производных* и выход бис-метиленовых производных невелик, достигая в оптимальных условиях 7—10%[43]. Кривая, выражающая зависимость выхода бис-метиленовых производных от концентрации формальдегида, имеет характерный колоколообразный вид[43, 45] с максимумом в области 0,1 *М*, что подтверждает необходимость для реакции исходного нуклеозида и N-метилольного производного типа VIII. Оптимум pH для этой реакции находится в слабокислой среде (pH ~4,8).

* Для препаративного получения соединения типа X из аденозина его выдерживали с раствором формальдегида в течение 393 (!) дней[41].

Как видно из изложенного, взаимодействие формальдегида с нуклеозидами и нуклеотидами протекает в чрезвычайно мягких условиях и эта реакция может быть легко перенесена на полинуклеотиды.

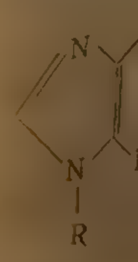
Скорость реакции формальдегида с полинуклеотидами в большой степени зависит от вторичной структуры полимера: реакция очень сильно замедляется или практически не протекает с двухцепочечными комплексами полинуклеотидов, стабилизованными водородными связями[46]. Поэтому обработка формальдегидом широко используется в исследованиях вторичной структуры полинуклеотидов (см. гл. 4). Эта реакция была применена для изучения вторичной структуры полиадениловой[47] и полицитидиловой[48] кислот, а также для определения размеров и стабильности двухспиральных участков РНК[39, 49–53] (см. также[141, 142]). Денатурированная ДНК быстро реагирует с формальдегидом, причем продукт реакции теряет способность к ренатурации[39, 40, 54]. Нативная ДНК, напротив, реагирует с формальдегидом крайне медленно[55]; анализ кинетики реакции показывает, что реакция начинается на «дефектном» участке двухспиральной структуры[56] и концентрацию таких участков можно определить[57]. Частичную денатурацию ДНК по специфическим участкам при действии формальдегида можно наблюдать под электронным микроскопом[143]. Модификация полинуклеотидов формальдегидом была применена и для некоторых функциональных исследований, в частности для изучения инактивации тРНК[58, 59] и для исследования изменения кодирующей способности полиадениловой кислоты в бесклеточной системе[35].

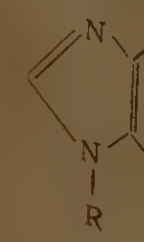
Напротив, для исследования первичной структуры нуклеиновых кислот модификация формальдегидом не может иметь большого значения из-за неустойчивости первичных продуктов реакции и крайне медленного образования устойчивых продуктов типа X*. Гораздо бóльшие перспективы в этом отношении имеет взаимодействие нуклеотидов с альдегидами, содержащими дополнительные функциональные группы, взаимодействие которых с гетероциклическим ядром может приводить к стабилизации продукта реакции. Примером использования такого подхода при разработке специфических реагентов для химической модификации нуклеиновых кислот может служить исследование взаимодействия компонентов нуклеиновых кислот с α-окисью акролеина XI[60]. Этот реагент способен гладко реагировать при pH 10,0 с гуанозином и дезоксигуанозином **, в то время как другие обычные нуклеозиды

---

* Тем не менее образование бис-(нуклеотидил)-метиленовых производных можно использовать для ковалентного связывания сближенных в пространстве участков цепи тРНК[140].

** С 1 *экв* альдегида XI реакция в этих условиях заканчивается для обоих нуклеозидов за 30 *мин* при комнатной температуре; в нейтральной среде она идет значительно медленнее.





не вступают в реакцию. Во взаимодействии участвуют экзоциклическая аминогруппа гуанина и атом азота N-1; в итоге образуется трициклический продукт XII:

XI + H_2C—CH—CHO (O) ⟶ XII

R — остаток рибозы или дезоксирибозы

$R' = CH_2OH$, $R'' = H$ или $R' = H$; $R'' = CH_2OH$

Необходимость для реакции незамещенных экзоциклической аминогруппы и атома N-1 подтверждается тем, что 2-*экзо*-N-диметилгуанин и 1-N-метилгуанин не способны вступать в эту реакцию; напротив, 8-бромгуанозин и 7-(β-оксиэтил)-гуанин дают продукты аналогичного типа. Спектр ЯМР продуктов реакции согласуется со структурой XII.

Подобным же путем протекает и взаимодействие гуанозина с α-дикарбонильными соединениями [61, 62]. Эта реакция впервые обнаружена при изучении инактивации вирусной РНК. При этом была найдена довольно хорошая корреляция между противовирусной активностью ряда α-кетоальдегидов и их способностью вступать во взаимодействие с гуанозином. Наиболее подробно изучалась реакция гуанозина с глиоксалем [62–65] и 3-этоксибутанон-2-алем-1 (кетоксалем) [61, 66].

+ CHO—CHO ⟶ XIII

R — остаток рибозы

Помимо гуанозина и его производных в реакцию способен вступать 2-*экзо*-N-метилгуанин [61, 64]; в противоположность этому 2-*экзо*-N,N-диметилгуанин [64], 1-N-метилгуанин [61] и 1-N-метилгуанозин [64] не взаимодействуют с глиоксалем. Это указывает на существенное значение группировки —NH—C(NHR)=N— для протекания реакции. Структура продукта реакции с глиоксалем как трициклического соединения XIII подтверждается данными ЯМР [62].

Продукт, образующийся из 3-этоксибутанон-2-аля-1, имеет, по-видимому, аналогичное строение.

Недавно было показано, что при окислении периодатом продукта реакции гуанина с кетоксалем образуется 2-*экзо*-N-(α-этоксипропионил)-гуанин [137]; это доказывает положение алкильного радикала в продукте реакции. Аналогичное строение имеет продукт реакции гуанина с пировиноградным альдегидом [137].

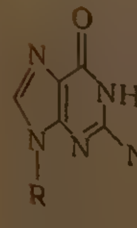
Количественная модификация гуанозин-5′-фосфата достигается [64] при действии 0,036 *М* (1%-ного) раствора глиоксаля в течение приблизительно 1 *ч* при 70° С и рН 6,8 (по более новым данным [137, 144], реакция идет быстрее при рН 7,0—8,5). Сообщалось об успешном проведении реакции при рН 4. По данным японских исследователей [65], которые контролировали прохождение реакции только спектрофотометрически, оптимум рН находится в щелочной области (рН 8,3—9,8) и реакция заканчивается за 2 *ч* (при комнатной температуре с 0,004 *М* раствором глиоксаля) *.

Продукт, образующийся при реакции гуанозина с глиоксалем, устойчив в кислой среде; в щелочной среде он довольно быстро разлагается с регенерацией гуанозина (время полупревращения при рН 10 и комнатной температуре составляет около 24 *ч* [64]). При действии азотистой кислоты происходит расщепление продукта XIII с образованием ксантозина [62]; окисление периодатом продукта, полученного модификацией гуанина (XIII, R = H), дает 2-*экзо*-N-формилгуанин [67, 137].

Под действием глиоксаля и 3-этоксибутанон-2-аля-1 легко может быть проведена модификация остатка гуанозина, входящего в состав олиго- или полинуклеотида. Оказалось, что продукт, полученный из динуклеозидмонофосфата GpC, не расщепляется под действием гуанил-РНК-азы T_1 [68]; в связи с этим модификацию глиоксалем удалось использовать для специфического химико-ферментативного расщепления тРНК [63, 64]. Из четырех компонентов РНК, производные которых могут служить субстратами для гуанил-РНК-азы T_1, гуанозин и 2-*экзо*-N-метилгуанозин модифицируются глиоксалем с образованием продуктов, не способных всту-

---

* Возможно, что в данном случае изменение УФ-спектра связано не с образованием трициклических продуктов типа XIII, а с образованием неустойчивых продуктов, аналогичных продуктам реакции с формальдегидом (типа VIII). Эти же авторы наблюдали характерные изменения УФ-спектра при инкубации фосфатов аденозина, цитидина и уридина с 0,145 *М* раствором глиоксаля. Ни в одной из работ, в которых протекание реакции контролировалось спектрофотометрически после разбавления реакционной смеси или с помощью хроматографических методов, никаких доказательств прохождения реакции с этими нуклеотидами и соответствующими нуклеозидами получить не удалось [61, 64]. Вместе с тем при окислении смеси аденина и глиоксаля действием периодата в тщательно контролируемых условиях был выделен 6-*экзо*-N-формиладенин [67], что свидетельствует о взаимодействии глиоксаля с аминогруппой аденина с образованием неустойчивых продуктов.



пать в ферментативную реакцию, 2-*экзо*-N,N-димегилгуанозин и инозин при действии глиоксаля не изменяются. Обработка тРНК в условиях, оптимальных для модификации мононуклеотидов *, дает полностью модифицированный полимер, который расщепляется ферментом в значительно меньшей степени, чем исходная тРНК.

Расщепление аналогичным путем индивидуальной валиновой тРНК из дрожжей приводит к образованию в основном крупных фрагментов.

При действии на тРНК из дрожжей [66] 3-этоксибутанон-2-аля-1 удалось подобрать условия, в которых модификации подвергаются только 15—20% остатков гуанозина — по-видимому, остатки, находящиеся в односпиральных участках полимера. После расщепления модифицированного продукта действием панкреатической пиримидил-РНК-азы можно идентифицировать олигонуклеотиды, соответствующие этим участкам полинуклеотидной цепи, и получить таким образом сведения о вторичной структуре полимера **. Модификация глиоксалем и этоксибутаноналем была использована также для функциональных исследований тРНК [66] и ДНК [69].

Взаимодействие гуанозина и его производных с нингидрином XIV [62] во многом аналогично рассмотренным выше реакциям. Реакция приводит к пентациклическому продукту XVa или XVб:

XIV

XVa

XVб

R–остаток рибозы

---

* При продолжительном взаимодействии тРНК с глиоксалем при 70° С из
остатков гуанозина происходит образование не продукта XIII, а иного вещества, неустановленного строения [64].

** Недавно списана частичная модификация фенилаланиновой тРНК из
дрожжей 3-этоксибутанон-2-алем-1, при которой затрагиваются только два
остатка гуанозина в молекуле [146].

Продукт реакции заметно менее устойчив в нейтральной и щелочной средах, чем соединение XIII, образующееся при реакции с глиоксалем. При реакции нингидрина с дезоксигуанозином хроматографически показано образование двух продуктов, которые могут быть изомерами XVa и XVб или стереоизомерами.

Нингидрин в отличие от других исследованных дикарбонильных соединений реагирует также и с цитидином и его производными[70]

XVI

R—остаток рибозы или рибозофосфата

В качестве второго центра, подвергающегося электрофильной атаке (помимо NH_2-группы), при этом выступает C-5 пиримидинового ядра, в результате чего образуется новая углерод-углеродная связь. Структура продукта реакции XVI согласуется с данными УФ-, ИК- и ЯМР-спектров; она подтверждена также рядом химических превращений. Реакция гладко протекает при комнатной температуре и нейтральных значениях pH. В случае цитидин-2′,3′-циклофосфата образование продукта завершается за 18 *ч*. Цитидин и цитидин-2′(3′)-фосфат реагируют несколько медленнее. Продукт реакции устойчив в щелочной среде. Это дает принципиальную возможность осуществить специфическую модификацию РНК по остаткам цитидина после обработки полимера нингидрином и последующего выдерживания при pH 9 (для расщепления продуктов типа XV, образующихся из гуанозиновых остатков).

3. Взаимодействие с азотистой кислотой

Как уже отмечалось выше, при реакции с азотистой кислотой содержащие аминогруппу пурины и пиримидины (и их производные), подобно аминопиридинам и алифатическим аминам, не дают устойчивых солей диазония. Промежуточно образующиеся диазосоединения легко распадаются, так что конечными продуктами реакции являются дезаминированные соединения. Например, при

реакции с азотистой кислотой аденозина, гуанозина и цитидина образуются соответственно инозин, ксантозин и уридин:

R — остаток рибозы

Для пуриновых и пиримидиновых оснований такое протекание реакции с азотистой кислотой было доказано еще в прошлом веке[71–73]; возможность проведения аналогичных реакций с нуклеозидами была продемонстрирована в 1910 г.[74], а с нуклеотидами — в 1932 г.[75]. Однако детальное исследование кинетики реакции с азотистой кислотой удалось провести лишь недавно[76], так как это было связано с техническими трудностями, вызываемыми постоянным изменением состава реакционной смеси (окислением нитрита, изменением pH и т. д.). Для получения воспроизводимых кинетических данных необходимо постоянно добавлять нитрит и кислоту или применять достаточно концентрированные буферные растворы. Скорость реакции удобно контролировать спектрофотометрически, поскольку продукты реакции заметно отличаются по своим УФ-спектрам от исходных соединений. Удовлетворительные результаты были получены также с помощью ионообменной хроматографии; применение для этой цели хроматографии на бумаге менее надежно.

Обычные условия реакции — обработка нуклеозида или нуклеотида нитритом натрия в уксусной кислоте или в ацетатных

буферных растворах*. Реакция протекает достаточно быстро, ее скорость возрастает в ряду

цитидин < аденозин < гуанозин

как об этом можно судить по значениям константы скорости реакции (табл. 6.2).

Таблица 6.2. **Константы скорости псевдопервого порядка при взаимодействии нуклеозидов с азотистой кислотой**[76]

Концентрация аденозина и цитидина 0,029 *М*, гуанозина 0,014 *М*, концентрация нитрита натрия 0,57 *М*; 3,7 *М* ацетатный буфер; 37,5°С

Нуклеозид	$k \cdot 10^2$, *мин*$^{-1}$		
	при pH 3,75	при pH 4,5	при pH 5,0
Гуанозин	8,5	1,8	0,37
Аденозин	3,3	0,70	0,16
Цитидин	2,4	0,44	0,062

Скорость дезаминирования быстро увеличивается при понижении pH; удивительно, что протонированная форма нуклеозида подвергается атаке электрофильного реагента быстрее, чем нейтральная форма. В самом деле, при pH 5,0 отношение скоростей реакции гуанозина и цитидина (оба нуклеозида находятся при этом главным образом в нейтральной форме) составляет 6,0, а при pH 3,75 (гуанозин — главным образом в нейтральной форме, цитидин — в протонированной) составляет уже 3,6. При понижении температуры реакции различие в скорости дезаминирования разных нуклеозидов несколько увеличивается.

Дезаминирование гуанозина под действием азотистой кислоты сопровождается побочными реакциями. Из продуктов реакции удалось выделить небольшое количество 2-нитроинозина XVII[76, 77].

При дезаминировании гуанина образуется в небольших количествах аналогичное соединение — 2-нитрогипоксантин и в очень малых количествах 8-нитроксантин XVIII. Соединение XVIII мо-

XVII   XVIII

* Для препаративного получения инозин-5′-фосфата из аденозин-5′-фосфата использовался амилнитрит в 50%-ной уксусной кислоте[146].

жет быть получено [76] с 5%-ным выходом из ксантозина при обработке его нитритом натрия в уксусной кислоте в жестких условиях (90° С, 3 дня).

Действие азотистой кислоты на метилированные рибонуклеозиды — редкие компоненты РНК — не изучено, однако при реакции с 6-*экзо*-N-метиладенином и 2-*экзо*-N-этилгуанином удается получить соответствующие N-нитрозо-N-алкилпроизводные [147].

При действии азотистой кислоты на дезоксинуклеозиды существенной побочной реакцией является расщепление N-гликозидной связи в продуктах дезаминирования, особенно в случае дезоксиксантозина, получающегося из дезоксигуанозина. Так, при pH 3,35 и 37° С дезоксиксантозин за 2 *ч* расщепляется до ксантина на 56%, в то время как дезоксиинозин, образующийся из дезоксиаденозина, дает за 24 *ч* 54% гипоксантина [78].

Дезаминированию под действием азотистой кислоты могут быть подвергнуты и остатки нуклеозидов в составе полинуклеотидов. Подобраны условия, в которых достигается полное дезаминирование ДНК [78, 79]; при этом, однако, в значительной степени происходит расщепление N-гликозидных связей пуриновых дезоксинуклеотидных звеньев. Отмечена и другая побочная реакция при обработке ДНК азотистой кислотой: получены доказательства образования небольшого количества ковалентных связей между комплементарными полинуклеотидными цепями, входящими в состав двухцепочечного комплекса ДНК [80-82]. Природа этой реакции не выяснена; возможно, что она состоит в алкилировании остатка нуклеозида (сближенного пространственно с нуклеозидом, который претерпевает дезаминирование) под действием промежуточно образующегося диазосоединения (ср. алкилирование диазометаном — стр. 359). Полного дезаминирования РНК удается добиться при действии нитрита натрия в ледяной уксусной кислоте [83]; при этом происходит заметная деградация полимера за счет расщепления фосфодиэфирных связей. В более мягких условиях обработки, когда побочные реакции сводятся к минимуму, протекает лишь частично дезаминирование ДНК и РНК. При этом происходит некоторое изменение относительной реакционной способности оснований, входящих в состав полимера, по сравнению со свободными нуклеотидами (табл. 6.3).

Модификация полинуклеотидов азотистой кислотой может быть применена для изучения первичной структуры полимеров, их макроструктуры и при функциональных исследованиях.

После исчерпывающего дезаминирования ДНК образующиеся на месте цитозиновых звеньев остатки урацила могут быть расщеплены под действием гидроксиламина (см. стр. 472) [78]. В дальнейшем возможно расщепление образующегося полимера по типу β-элиминации (см. гл. 10) и по тем участкам, где раньше находились остатки дезоксицитидина. Ценность этого метода для расщеп-

ления ДНК, однако, довольно сомнительна, так как побочная реакция расщепления N-гликозидной связи в остатках дезоксиксантозина должна приводить также к расщеплению по местам исходных остатков дезоксигуанозина.

Таблица 6.3. **Относительная скорость дезаминирования оснований при взаимодействии полинуклеотидов с азотистой кислотой**

Полинуклеотид	Условия реакции	Отношение констант скоростей реакции или выходов оснований: гуанин/цитозин	Отношение констант скоростей реакции или выходов оснований: аденин/цитозин	Литература
Рибонуклеозиды	0,57 *M* $NaNO_2$; 3,1 *M* ацетатный буфер (pH 4,5); 21,5°C	6,5	2,2	*76*
тРНК из E. coli	1,0 *M* $NaNO_2$; 0,25 *M* ацетатный буфер (pH 4,3); 21°C	2,1	1,4	*84*
РНК, выделенная из вируса табачной мозаики	То же	2,1	1,3	*85*
РНК в составе вируса табачной мозаики	1,0 *M* $NaNO_2$; 1 *M* ацетатный буфер (pH 4,2); 21°C	0,01	0,53	*86*
ДНК тимуса теленка, нативная	1 *M* $NaNO_2$; 0,25 *M* ацетатный буфер (pH 4,2); 20°C	2,2	0,44	*87*
Та же ДНК, денатурированная	То же	1,3	0,63	*87*

Данный метод, вероятно, может оказаться полезным для анализа распределения остатков тимидина и дезоксицитидина в полипиримидиновых олигодезоксинуклеотидах. Применение дезаминирования РНК для анализа последовательности нуклеотидных звеньев основано на том, что производные ксантозина являются значительно худшими субстратами для гуанил-РНК-азы T_1, чем производные инозина. Вследствие этого удалось подобрать условия, в которых дезаминированная РНК может быть специфически расщеплена под действием фермента по остаткам инозина [83], т. е. по тем участкам полинуклеотидной цепи, где в исходном полимере были остатки аденозина.

Некоторые выводы о макроструктуре полинуклеотидов могут быть сделаны на основании сравнения скоростей дезаминирования нуклеотидных звеньев в различных полинуклеотидах. Так, например, бóльшая скорость дезаминирования ДНК внутри фаговой ча-

стицы фага S_D по сравнению со свободной двухцепочечной ДНК, полученной из этого же источника, позволила сделать вывод об особой макроструктуре ДНК в комплексе с белком фаговой оболочки[88]. При этой конформации аминогруппы гетероциклических оснований более доступны, чем в двухцепочечном комплексе ДНК.

Другой подход к использованию модификации азотистой кислотой для исследования макроструктуры полинуклеотидов состоит в частичном дезаминировании полинуклеотида в мягких условиях и идентификации участков полинуклеотидной цепи, подвергшихся реакции. Этот подход был успешно применен, например, к аланиновой тРНК из дрожжей[89].

Изучалось также влияние частичного дезаминирования полинуклеотидов на способность тРНК вступать в биохимические реакции[84, 90], а также на способность синтетических полинуклеотидов служить матрицей для ДНК-полимеразы[91] или функционировать в бесклеточной системе биосинтеза белка[92]. Азотистая кислота является эффективным мутагеном. По современным представлениям (обзор — см.[93]), этот мутагенный эффект связан с дезаминированием остатков аденина и цитозина, так как продукты таких реакций — гипоксантин и урацил — способны образовывать комплементарные пары с цитозином и аденином. Дезаминирование же остатка гуанина приводит в основном к инактивации генетического материала.

4. Прочие реакции замещения по аминогруппе

Помимо упомянутых выше реакций аминогруппа гетероциклических оснований (и их производных) может подвергаться атаке и некоторыми другими электрофильными реагентами. Важное значение для получения защищенных производных, используемых при синтезе олигонуклеотидов, имеет взаимодействие аденозина, цитидина, гуанозина и соответствующих дезоксирибонуклеозидов с бис-(алкокси)-диметиламинометанами (ацеталями диметилформамида)[94–96], приводящая к N,N-диметиламинометилиденовым производным XIX:

$$R{-}NH_2 + (C_2H_5O)_2CHN(CH_3)_2 \longrightarrow \underset{XIX}{R{-}N{=}CHN(CH_3)_2} + 2C_2H_5OH$$

$R{-}NH_2$ — нуклеозид

Реакция гладко протекает при комнатной температуре в диметилформамиде или диметилсульфоксиде; отсутствие аминогруппы в продукте реакции подтверждается данными ИК-спектров. Образующиеся N,N-диметиламинометилиденнуклеозиды устойчивы в обычных условиях синтеза олигонуклеотидов; их расщепление с регенерацией исходного нуклеозида происходит при кипячении

в спирте или при обработке разбавленным аммиаком*. Реакция легко может быть проведена и с олигонуклеотидами[97, 98].

В тех случаях, когда в реакцию вводится рибонуклеозид, происходит также образование О-диметиламинометилиденовых производных (например, XX). Эти соединения, однако, очень легко расщепляются уже при добавлении воды, так что получение рибонуклеозидов, защищенных только по аминогруппе, не представляет трудностей.

$N{=}CHN(CH_3)_2$

XX

R — остаток 2′,3′-О-(диметиламинометилиден)-рибозы

Другая побочная реакция, которая может протекать при действии бис-(этокси)-диметиламинометана на олигонуклеотиды, — алкилирование остатков уридина[94]. Было найдено, однако, что подобного алкилирования не наблюдается при использовании бис-(неопентил)-диметиламинометана[97].

Как уже упоминалось выше (см. гл. 5), при действии алкилирующих агентов на нуклеозиды обычно происходит алкилирование по атомам азота гетероциклического ядра. В некоторых случаях, однако, возможно замещение по азоту аминогруппы, хотя строение продуктов реакции в большинстве случаев строго не доказано. Так, при обработке трифенилхлорметаном нуклеозидов, содержащих аминогруппу, наряду с образованием О-тритильных производных наблюдается N-тритилирование[99]; эта реакция в еще большей степени протекает с производными трифенилхлорметана, содержащими в фенильных заместителях одну или несколько *п*-метоксильных групп[14, 17, 31]. Такая реакция особенно характерна для производных гуанозина, где N-тритилирование идет быстрее, чем О-тритилирование[31]. N-Диметиламинометилиденнуклеозиды не вступают в эту реакцию[96].

Виниловые эфиры, широко используемые для защиты гидроксильных групп остатка сахара в нуклеозидах и нуклеотидах — дигидропиран и этилвиниловый эфир, — могут в несколько более жестких условиях вступать в реакцию и по аминогруппе. Удалось, например, получить 6-экзо-N,2′,5′-три-(тетрагидропиранил)-аденозин-3′-фосфат[13], 5′-ацетил-2-*экзо*-N,2′-ди-(тетрагидропиранил)-гуанозин-3′-фосфат[100] и 6-*экзо*-N,2′,5′-три-(α-этоксиэтил)-аденозин-

* О кинетике гидролиза N-диметиламинометилиденнуклеозидов см.[148].

3′-фосфат[100]. Строение двух последних соединений доказано их неспособностью реагировать с ацеталями диметилформамида. N-Тетрагидропиранильная группа в производном гуанозина может быть избирательно отщеплена мягким кислотным гидролизом без затрагивания O-тетрагидропиранильной группировки.

При взаимодействии гуанозина с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой протекает гладкое арилирование с образованием 2-*экзо*-N-пикрилгуанозина[101]:

$$\text{Гуанин(9-R)}-NH_2 + HO_3S-C_6H_2(NO_2)_3 \longrightarrow \text{Гуанин(9-R)}-NH-C_6H_2(NO_2)_3$$

R — остаток рибозы

Реакция протекает в достаточно мягких условиях и может быть применена для специфической модификации остатка гуанозина в РНК; побочным процессом при этом является взаимодействие с концевой фосфомоноэфирной группировкой полинуклеотидной цепи, которое можно использовать для метки концевого нуклеотидного остатка.

Реакция с участием экзоциклической аминогруппы, по-видимому, является основной при обработке нуклеозидов и нуклеотидов солями диазония. Наиболее подробно изучено взаимодействие нуклеозидов с диазотированными сульфаниловой кислотой[102] и 2-аминобензол-1,4-дисульфокислотой[103]. В первом случае основным продуктом реакции является диазоаминосоединение XXI (максимум поглощения в области 370—440 *ммк*):

$$R-NH_2 + {}^{+}N_2-C_6H_4-OSO_3^- \xrightarrow{-H^+} R-NH-N=N-C_6H_4-SO_3^-$$

XXI

R—NH$_2$ — нуклеозид или нуклеотид

Реакция быстро протекает в слабощелочной среде. Например, в случае гуанозин-2′(3′)-фосфата при pH 10 и 2 °C превращение

заканчивается за 2 *ч*. За это же время аденозин-2′(3′)-фосфат превращается на 30%, а цитидин-2′(3′)-фосфат — на 10%. Кривая зависимости скорости реакции от pH имеет колоколообразный вид (рис. 6.3), причем оптимум pH для реакции с производным гуанозина (10,2) заметно отличается от оптимума pH для производных аденозина и цитидина (10,7). Продукты реакции неустойчивы

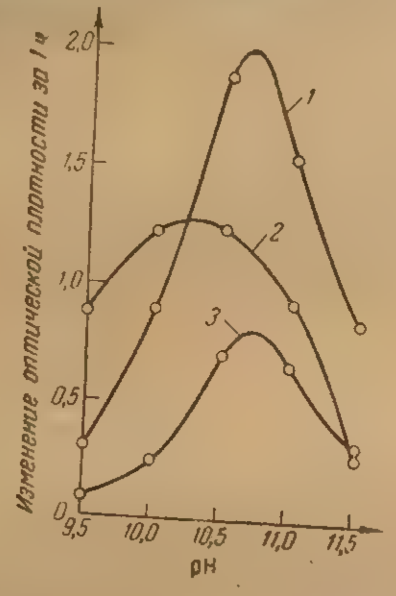


Рис. 6.3. Зависимость скорости реакции нуклеотидов с диазотированной сульфаниловой кислотой от pH [102]:

1 — реакция аденозин-2′(3′)-фосфата (при 400 *ммк*); *2* — гуанозин-2′(3′)-фосфата (при 370 *ммк*); *3* — цитидин 2′(3′)-фосфата (при 370 *ммк*); концентрация реагента 0,05 *моль/л*; ~20° С.

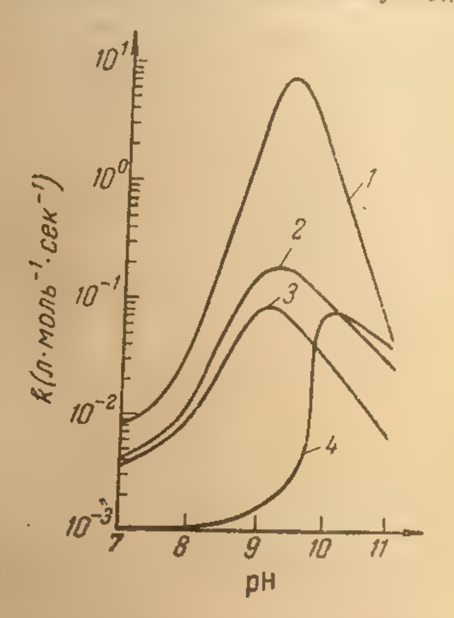


Рис. 6.4. Зависимость скорости реакции дезоксинуклеозид-5′-фосфатов с диазотированной 2-аминобензол-1,4-дисульфокислотой от pH [103]:

1 — реакция дезоксигуанозин-5′-фосфата; *2* — тимидин-5′-фосфата; *3* — дезоксиаденозин-5′-фосфата; *4* — дезоксицитидин-5′-фосфата; 22 °C; μ = 0,15.

в кислой среде; они быстро разлагаются уже при pH 3. Скорость разложения максимальна в случае производных аденозина, наиболее устойчив продукт реакции с гуанозином. При взаимодействии диазотированной сульфаниловой кислоты с пуриновыми нуклеотидами образуются и побочные продукты (по данным электрофореза на бумаге). Для аденозин-2′(3′)-фосфата степень протекания побочных реакций невелика; при реакции гуанозин-2′(3′)-фосфата получено три вещества в соотношении 7 : 2 : 1. Одно из них может быть изомерным соединению XXI диазоаминосоединением XXII

$$R—N{=}N—NH—C_6H_4—SO_3^-$$

XXII

так как при кислотном гидролизе образующейся смеси наряду с гуанозин-2′(3′)-фосфатом образуется заметное количество ксан-

тозин-2'(3')-фосфата. Другой продукт образуется, по-видимому, в результате реакции замещения по С-8 ядра *.

Взаимодействие диазотированной 2-аминобензол-1,4-дисульфокислоты с дезоксинуклеотидами протекает, по-видимому, сходным образом **. Кинетика этой реакции аналогична рассмотренной выше для реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой, хотя оптимум pH несколько сдвинут в более кислую область (рис. 6.4). Дезоксигуанозин-5'-фосфат при pH 9 (оптимальное значение) реагирует с диазотированной 2-аминобензол-1,4-дисульфокислотой по крайней мере в 60 раз быстрее, чем остальные дезоксинуклеотиды.

Реакция с диазотированной сульфаниловой кислотой может быть успешно применена для модификации остатков гуанозина и аденозина в ДНК и РНК[107]; остатки цитидина в полинуклеотидной цепи не затрагиваются. Можно провести реакцию таким образом, что остатки аденозина и гуанозина в РНК модифицируются полностью (pH 10,7), или получить полную модификацию гуанозина при небольшой модификации аденозина (pH 10). Используя различия в значении оптимума pH и различную устойчивость полученных продуктов, можно добиться почти полной модификации остатков гуанозина при незначительной модификации других остатков нуклеозидов.

Диазониевые соли, содержащие две или более сульфогрупп, представляют значительный интерес как реагенты для введения в молекулу полинуклеотидов специфических группировок, могущих быть использованными для определения последовательности мономерных звеньев в цепи (см. гл. 1). Сульфогруппы способны прочно связывать ионы уранила, после чего их можно наблюдать на электронной микрофотографии[108]. Было исследовано применение для этой цели диазотированной 2-аминобензол-1,4-дисульфокислоты[109, 110], с помощью которой оказалось возможным добиться 80%-ной модификации остатков гуанозина в ДНК при модификации остальных нуклеозидных звеньев не более 5%. В случае РНК специфичность этой реакции заметно меньше: при 60%-ной модификации остатков гуанозина степень реакции остатков прочих нуклеозидов составляет около 10%. Однако даже при такой степени побочных реакций проблема локализации остатка гуанозина в полинуклеотидной цепи может быть решена[110].

---

* Из продуктов реакции гуанозина и дезоксигуанозина с диазотированной сульфаниловой кислотой выделены соединения, дающие при мягком кислотном гидролизе 8-(*п*-бензолсульфонил)-гуанин и 8-(*п*-бензолсульфонил)-ксантин[104].

** Первоначально предполагалось[103], что из дезоксигуанозин-5'-фосфата получается продукт азосочетания по С-8 — по аналогии с известной реакцией такого типа для простых пуринов[105, 106]. Считалось также, что продукты, образующиеся из дезоксицитидин-5'-фосфата, дезоксиаденозин-5'-фосфата и тимидин-5'-фосфата, возникают в результате реакции по остатку сахара.

Возможно, что взаимодействие с аминогруппами оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот, лежит в основе канцерогенного действия некоторых азокрасителей, например, *п*-диметиламиноазобензола, легко окисляющегося в организме с образованием N-оксиметильных производных. Было высказано предположение, что аналогичные соединения могут возникать (хотя бы в небольших количествах) и в смеси *п*-аминоазобензола с формальдегидом:

$$C_6H_5{-}N{=}N{-}C_6H_4{-}NH_2 + CH_2O \rightleftarrows C_6H_5{-}N{=}N{-}C_6H_4{-}NHCH_2OH$$

Было найдено, что при обработке РНК и ДНК смесью *п*-аминоазобензола и формальдегида происходит интенсивная модификация остатков цитозина, аденина и гуанина [111]. Подобные реакции проведены и на уровне нуклеозидов. Продукту реакции с дезоксицитидином приписана структура XXIII

XXIII
R — остаток дезоксирибозы

III. РЕАКЦИИ ЗАМЕЩЕНИЯ У ЭКЗОЦИКЛИЧЕСКИХ АТОМОВ КИСЛОРОДА И СЕРЫ

Как указывалось в гл. 3, преобладающей таутомерной формой урацила, гуанина, гипоксантина и других аналогичных оснований (и их производных) является кетоформа. При этом атом кислорода отдает в сопряженную систему один электрон и, следовательно, должен обладать частичным отрицательным зарядом и подвергаться атаке электрофильными реагентами. Таких реакций, однако, почти неизвестно; предпочтительным местом атаки электрофильных агентов* является обычно один из атомов азота гетероциклического кольца. Редкие компоненты тРНК, содержащие серу (4-тиоуридин и производные 2-тиоуридина), по своей электронной структуре аналогичны соответствующим кислородным соединениям. Однако в силу значительно больших размеров атома серы *п*-электроны связаны заметно слабее. Вследствие этого при сопряжении с гетероциклическим ядром на атоме серы возникает значительно больший отрицательный заряд, и он легче подвергается атаке электрофильных агентов, чем атомы азота гетероциклического ядра. С другой стороны, может происходить легкая отдача электронов соответствующему акцептору, т. е. окисление серосодержащих нуклеозидов.

1. О-Алкилирование и образование циклонуклеозидов

Выше уже указывалось (см. стр. 359), что основным направлением алкилирования нуклеозидов под действием алкилирующих агентов типа диазометана является реакция по атомам азота гетероциклического ядра. В некоторых случаях, однако, в качестве побочных продуктов удается выделить и О-метильные производные, возникающие за счет замещения у экзоциклического атома кислорода. При метилировании уридина и тимидина такие продукты не обнаружены, но для некоторых производных этих соединений, например для 1-(β-*D*-арабинофуранозил)-5-фторурацила [112], они были выделены. При метилировании дезоксигуанозина диазометаном в эфире одним из продуктов реакции является 2-амино-6-метокси-9-(β-*D*-2′-дезоксирибофуранозил)-пурин [113]. Из продуктов метилирования 2′,3′,5′-три-О-ацетилинозина [114] или инозина [115] был выделен 6-метокси-9-(β-*D*-рибофуранозил)-пурин; выход его достигает 20%. О-Метилирование по экзоциклической карбонильной группе урацила и по гидроксильным группам остатка сахара отмечалось также при обработке тритилированных уридинов иодистым метилом и окисью серебра [116].

В тех случаях, когда алкилирование по экзоциклическому атому кислорода является единственно возможным (по стерическим соображениям) направлением реакции, такое превращение протекает быстро и с высоким выходом. Подобная ситуация наблюдается при образовании циклонуклеозидов в результате внутримолекулярного алкилирования экзоциклического кислорода при С-2 пиримидинового кольца под действием алкилирующей группы, соединенной с остатком пентозы. Были получены 2-*экзо*-О,2′-, 2-*экзо*-О,3′- и 2-*экзо*-О,5′-циклонуклеозиды производных уридина, тимидина, цитидина и их аналогов (обзоры — см. [117, 118]). Для получения этих циклонуклеозидов используют обработку соответствующих мезилатов или тозилатов основаниями или действие солей серебра на галогенпроизводные.

$TsOCH_2$ — $(CH_3)_3CONa$ [$(CH_3)_3COH$] → CH_2 ← CH_3COOAg (CH_3CN) — ICH_2; $C(CH_3)_2$

Циклонуклеозиды широко применяются для синтеза аналогов нуклеозидов с модифицированным гетероциклическим ядром и остатком моносахарида [117–119].

2. S-Алкилирование производных тиопиримидинов

При действии алкилирующих агентов на тиопиримидиновые нуклеозиды замещение у атома серы является основным направлением реакции.

Действие диазометана на 5′-О-ацетил-2′,3′-О-изопропилиден-4-тиоуридин XXIV приводит к смеси продуктов S-метилирования XXV и N-метилирования XXVI в соотношении 3 : 1 [120].

При метилировании 4-тиоуридина и его производных иодистым метилом в присутствии щелочи S-метильное производное является единственным продуктом реакции [121, 122]. Аналогичная реакция хорошо известна и для производных 6-меркаптопуриннуклеозидов; в этом случае удалось даже провести избирательное S-метилирование нуклеотидов без затрагивания фосфатной группы [123].

Замещение у атома серы может происходить и под действием реагентов, содержащих поляризованную двойную связь; при этом образуются S-алкильные производные. Из реагентов такого рода лучше всего изучено действие акрилонитрила [124] и N-этилмалеинимида [125].

Как отмечалось выше (см. стр. 381), при взаимодействии акрилонитрила с нуклеозидами и нуклеотидами происходит алкилирование по атомам азота гетероциклического ядра, причем можно добиться специфической модификации остатков псевдоуридина и инозина в цепи тРНК. 4-Тиоуридин также гладко вступает в реакцию с акрилонитрилом, образуя продукт S-алкилирования XXVII

(2-тиоуридин в аналогичных условиях не реагирует):

$$+ CH_2{=}CHCN \longrightarrow$$

SCH_2CH_2CN

XXVII

R — остаток рибозы

Скорость реакции возрастает при увеличении pH (рис. 6.5); это позволяет считать, что в реакции участвует ионизированная форма 4-тиоуридина. При pH 9,0 в 1 *M* растворе акрилонитрила при 30 °C время полупревращения 4-тиоуридина составляет около 2,5 *ч*. Продукт реакции легко расщепляется в щелочной среде с регенерацией исходного 4-тиоуридина.

В еще более мягких условиях протекает взаимодействие 4-тиоуридин-2′(3′)-фосфата с N-этилмалеинимидом[125]; при pH 7,8 и 37 °C реакция в 0,003 *M* растворе реагента завершается за 3 *ч*. УФ-Спектры и данные электрофореза продукта реакции согласуются со структурой XXVIII (2-тиоуридин и его фосфаты не вступают в подобную реакцию).

Рис. 6.5. Зависимость скорости реакции 4-тиоуридина с акрилонитрилом от pH[124]

$$k_0 = k_{набл} - k' \frac{[OH^-]}{[A]}$$

где $[A]$ — концентрация акрилонитрила; k' — константа скорости щелочного гидролиза производного XXVII (1*M* раствор реагента; 30 °C).

$N{-}CH_2CH_3$

XXVIII

R — остаток рибозофосфата

Условия данной реакции хорошо подходят для модификации полинуклеотида. Обработка тРНК из разных источников радиоактивным N-этилмалеинимидом показывает, что радиоактивная метка включается в полимер только в тех случаях, когда тРНК содержит остатки 4-тиоуридина, т. е. реакция высокоспецифична. Реакцию можно использовать для определения содержания остатков 4-тиоуридина в тРНК [125]. При полной модификации остатков 4-тиоуридина суммарная акцепторная активность тРНК из *E. coli* понижается на 10—12%.

Под действием этиленимина легко протекает S-аминоэтилирование 4-тиоуридина [126]:

$$\text{4-тиоуридин (S, NH, N–R, =O)} + H_2C\text{—}CH_2\text{ (NH)} \longrightarrow \text{(}SCH_2CH_2NH_2\text{, N, N–R, =O)}$$

R — остаток рибозы

С помощью этой реакции, проводя ее при pH 8,0 и 25 °C, можно осуществить специфическую модификацию тРНК по остаткам 4-тиоуридина.

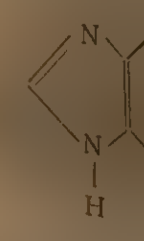
Взаимодействие с бромцианом. Обработка 4-тиоуридина бромцианом при pH 8,9 и комнатной температуре быстро приводит к производному XXIX [127]:

$$\text{4-тиоуридин (S, NH, N–R, =O)} + BrCN \longrightarrow \text{(SCN, N, N–R, =O)}$$

XXIX

R — остаток рибозы

Аналогично реагируют различные меркаптопурины и их производные [128]. Хотя способность 2-тиоуридина вступать в эту реакцию не исследовалась, можно думать, что он будет себя вести подобно 4-тиопроизводному. Обычные нуклеозиды не вступают в реакцию с бромцианом, и поэтому данный реагент может быть применен для специфической модификации тРНК [127].



3. Окисление производных тиопиримидинов

Под действием разбавленного раствора иода в водном растворе иодистого калия при pH, близком к нейтральному, 4-тиоуридин быстро превращается в соответствующий дисульфид XXX [129–132]:

$I_2 + KI$

$HSCH_2CH_2OH$ или $Na_2S_2O_3$

XXX

R — остаток рибозы

Обратное превращение можно осуществить при обработке дисульфида XXX 2-меркаптоэтанолом или тиосульфатом; восстановление протекает быстро и количественно [129, 131]. В щелочной среде дисульфид XXX расщепляется с образованием 4-тиоуридина и сульфеновой кислоты XXXIII [132, 133, 149]; этот процесс, по-видимому, аналогичен расщеплению дисульфида 6-меркаптопурина XXXI под действием щелочи в бескислородной среде до 6-меркаптопурина и пурин-6-сульфиновой кислоты XXXII [134]

XXXI → XXXII

Обработка тРНК из *E. coli*, содержащих остатки тиопиримидинов, растворами иода в водном растворе KI [132, 135, 136] приводит к резкому уменьшению способности акцептировать аминокислоты и некоторому изменению кривой дисперсии оптического вращения. Из продуктов гидролиза окисленной суммарной тРНК из *E. coli* удалось выделить нуклеотид, являющийся производным дисульфида 4-тиоуридина XXX [132]. При окислении очищенной тирозиновой тРНК из *E. coli*, содержащей два остатка 4-тиоуридина, были получены доказательства внутримолекулярного образования дисульфида [131]; однако акцепторная активность тРНК и ее конформация изменяются в этом случае лишь незначительно. На основании сопоставления данных по изменению биологической актив-

ности тРНК при алкилировании N-этилмалеинимидом и окислении раствором иода в растворе KI высказано предположение[136], что потеря акцепторной активности тРНК, вызываемая действием раствора иода в KI, происходит главным образом за счет образования дисульфидов из остатков 2-тиоцитидина и 5-метиламинометил-2-тиоуридина. Проводя окисление тРНК иодом в присутствии избытка 2-меркаптоэтанола или цистеина, можно добиться образования смешанных (второй компонент — не нуклеозидный остаток) дисульфидов[125]. Обработанная таким образом суммарная тРНК из *E. coli* почти полностью сохраняет свою биологическую активность.

При окислении 4-тиоуридина и его производных $KMnO_4$ в мягких условиях образуется[150] уридин-4-сульфоновая кислота XXXIV, которая под действием различных нуклеофильных агентов легко претерпевает замещение при C-4.

S—OH SO$_2$OH

XXXIII XXXIV

R — остаток рибозы

Аналогичные продукты были получены при окислении 2′,3′-O-изопропилиден-4-тиоуридина и 2′-дезокси-4-тиоуридина периодатом[151]. Периодатное окисление с последующей реакцией с ^{14}C-метиламином предложено использовать для локализации положения остатков 4-тиоуридина в тРНК[152]. Возможно, что обнаруженное недавно фотохимическое превращение 4-тиоуридина в уридин и цитидин[153] также протекает через образование производных сульфоновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1959, 3655.
2. Sasaki T., Mizuno Y., Chem. Pharm. Bull., 15, 894 (1967).
3. Van Montagu M., Stockx J., Arch. Int. Physiol. Biochim., 73, 158 (1965).
4. Mizuno Y., Itoh T., Tagawa H., Chem. Ind., 1965, 1498.
5. Cramer F., Saenger W., Scheit K. H. Tennigkeit J., Ann. 679, 156 (1964).
6. Николенко Л. Н., Незавибатько В. Н., Толмачева Н. С., ХПС. 1967, 539.
7. Николенко Л. Н., Незавибатько В. Н., Семенова М. И., ЖОХ, 39, 223 (1969).
8. Watanabe K. A., Fox J. J., Angew. Chem., 78, 589 (1966).

9. Otter B. A., Fox J. J., in «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», Zorbach W. W., Tipson R. S. (eds), v. 1, Interscience Publ., New York — London — Sydney — Toronto, 1968, p. 285.
10. Anteonis M., Van Montagu M., Bull. Soc. chim. Belg., **74**, 481 (1965).
11. Van Montagu M., Molemans F., Stockx J., Bull. Soc. chim. Belg., **77**, 471 (1968).
12. Brown D. M., Todd A., Varadarajan S., J. Chem. Soc., **1956**, 2384.
13. Rammler D. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 3112 (1962).
14. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3821 (1963).
15. Bentley H. R., Cunningham K. G., Spring F. S., J. Chem. Soc., **1951**, 2301.
16. Weygand F., Wirth F., Chem. Ber., **85**, 1000 (1952).
17. Smith M., Rammler D. H., Goldberg I. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 430 (1962).
18. Hall R. H., Biochemistry, **3**, 769 (1964).
19. Lohrmann R., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4188 (1964).
20. Fromageot H. P. M., Reese C. B., Sulston J. B., Tetrahedron, **24**, 3533 (1968).
21. Соколова Н. И., Баканова В. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., ЖОХ, **33**, 2480 (1963).
22. Letsinger R. L., Miller P. S., Grams G. W., Tetrahedron Letters, **1968**, 2621.
23. Khorana H. G., Turner A. F., Vizsolyi J. P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 686 (1961).
24. Шабарова З. А., Соколова Н. И., Бойкова Л. А., Прокофьев М. А., ЖОХ, **29**, 2917 (1959).
25. Шабарова З. А., Соколова Н. И., Прокофьев М. А., ЖОХ, **27**, 2891, 3028 (1957); **29**, 539 (1959).
26. Соколова Н. И., Баканова В. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., Биохимия, **27**, 1079 (1962).
27. Шабарова З. А., Полякова З. П., Прокофьев М. А., ЖОХ, **29**, 215 (1959).
28. Chheda G. B., Hall R. H., Biochemistry, **5**, 2082 (1966).
29. Tener G. M., J. Am. Chem. Soc., **83**, 159 (1961).
30. Ralph R. K., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2926 (1961).
31. Ralph R. K., Connors W. J., Schaller H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1983 (1963).
32. Lapidot Y., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3857 (1963).
33. Chladek S., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **29**, 214 (1964).
34. Chladek S., Žemlička J., Coll. Czech. Chem. Comm., **31**, 1785 (1966).
35. Michelson A. M., Grunberg-Manago M., Biochim. Biophys. Acta, **91**, 92 (1964).
36. Fraenkel-Conrat H., Biochim. Biophys. Acta, **15**, 307 (1954).
37. Hoard D. E., Biochim. Biophys. Acta, **40**, 62 (1960).
38. Lewin S., Humphreys D. A., J. Chem. Soc. (B), **1967**, 562.
39. Haselkorn R., Doty P., J. Biol. Chem., **236**, 2738 (1961).
40. Grossman L., Levine S. S., Allison W. S., J. Mol. Biol., **3**, 47 (1961).
41. Фельдман М. Я., Биохимия, **27**, 378 (1962).
42. Фельдман М. Я., Шубина М. Р., ДАН СССР, **174**, 236 (1967).
43. Feldman M. Ya., Biochim. Biophys. Acta, **149**, 20 (1967).
44. Фельдман М. Я., Биохимия, **30**, 203 (1965).
45. Фельдман М. Я., Биохимия, **29**, 720 (1964).
46. Staehelin M., Biochim. Biophys. Acta, **29**, 410 (1958).
47. Stevens C. L., Rosenfeld A., Biochemistry, **5**, 2714 (1966).
48. Fasman G. D., Lindlow C., Grossman L., Biochemistry, **3**, 1015 (1964).

28 Зак. 614

49. Penniston J. T., Doty P., Biopolymers, 1, 145 (1963).
50. Stanley W. M., Bock R. M., Biochemistry, 4, 1302 (1965).
51. Marciello R., Zubay G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 14, 272 (1964).
52. Fasman G. D., Lindblow C., Seaman E., J. Mol. Biol., 12, 630 (1965).
53. Boedtker H., Biochemistry, 6, 2718 (1967).
54. Stollar D., Grossman L., J. Mol. Biol., 4, 31 (1962).
55. Lewin S., Arch. Biochem. Biophys., 113, 584 (1966); Berns K. I., Thomas C. A., J. Mol. Biol., 3, 289 (1961).
56. Трифонов Э. Н., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д., Мол. биол., 1, 164 (1967).
57. Трифонов Э. Н., Шафрановская Н. Н., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С., Мол. биол., 2, 887 (1968).
58. Penniston J. T., Doty P., Biopolymers, 1, 209 (1963).
59. Куханова М. К., Киселев Л. Л., Фролова Л. Ю., Биохимия, 28, 1053 (1963).
60. Goldschmidt B. M., Blazei T. P., Van Duuren V. L., Tetrahedron Letters, 1968, 1583.
61. Staehelin M., Biochim. Biophys. Acta, 31, 488 (1959).
62. Shapiro R., Hachmann J., Biochemistry, 5, 2799 (1966).
63. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Broude N. E., Klebanova L. M., Biochim. Biophys. Acta, 134, 492 (1967).
64. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Броуде Н. Е., Мол. биол., 1, 214 (1967).
65. Nakaya K., Takenaka O., Horinishi H., Shibata K., Biochim. Biophys. Acta, 161, 23 (1968).
66. Litt M., Hancock V., Biochemistry, 6, 1848 (1967).
67. Shapiro R., Agarwal S. C., Cohen B. I., Abstr. Papers XXI[st] Congr. IUPAC, Nucleic Acid Chem., Prague, 1967, N 7.
68. Whitfeld P., Witzel H., Biochim. Biophys. Acta, 72, 338 (1963).
69. Броуде Н. Е., Басс И. А., Будовский Э. И., Biochem. Biophys. Acta (in press).
70. Shapiro R., Agarwal S. C., J. Am. Chem. Soc., 90, 474 (1968).
71. Strecker A., Ann., 118, 166 (1861).
72. Kossel A., Ber., 18, 1928 (1885).
73. Kossel A., Steudel H., Z. physiol. Chem., 37, 377 (1903).
74. Levene P. A., Jacobs W. A., Ber., 43, 3150 (1910).
75. Lohman K., Biochem. Z., 254, 381 (1932).
76. Shapiro R., Pohl S. H., Biochemistry, 7, 448 (1968).
77. Shapiro R., J. Am. Chem. Soc., 86, 2948 (1964).
78. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochemistry, 5, 3012 (1966).
79. Matsuda M., Ogoshi H., Biochim. Biophys. Acta, 119, 210 (1966).
80. Geiduschek E. P., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47, 950 (1961).
81. Becher E. F., Zimmerman B. K., Geiduschek E. P., J. Mol. Biol., 8, 377 (1964).
82. Horn E. E., Herriot R. M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 48, 1409 (1962).
83. Ushida T., Egami F., J. Biochem., 57, 742 (1965).
84. Carbon J. A., Biochim. Biophys. Acta, 95, 550 (1965).
85. Schuster H., Schramm G., Z. Naturforsch., 13b, 697 (1958).
86. Schuster H., Wilhelm R. C., Biochim. Biophys. Acta, 68, 554 (1963).
87. Schuster H., Z. Naturforsch, 15b, 304 (1960).
88. Tikhonenko T. I., Dobrov E. N., Velikodvorskaya G. A., Kiseleva N. P., J. Mol. Biol., 18, 58 (1966).
89. Nelson J. A., Ristow S. C., Holley R. W., Biochim. Biophys. Acta, 149, 590 (1967).
90. Carbon J., Gurry J. B., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 59, 467 (1968).
91. Kotaka T., Baldwin R. L., J. Mol. Biol., 9, 323 (1964).

92. Basilio C., Wahba A. J., Lengyel P., Speyer J. F., Ochoa S., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **48**, 613 (1962).
93. Orgel R. C., Adv. Enzymology, **27**, 289 (1965).
94. Žemlička J., Coll. Czech. Chem. Comm., **28**, 1060 (1963).
95. Žemlička J., Chladek S., Holý A., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **31**, 3198 (1966).
96. Žemlička J., Coll. Czech. Chem. Comm., **32**, 3159 (1967).
97. Holý A., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **31**, 3800 (1966).
98. Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **33**, 1462 (1968).
99. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 2476.
100. Brimacombe R., Kemper W., Jaonini T., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **33**, 2074 (1968).
101. Azegawi M., Iwai K., J. Biochem., **55**, 346 (1964).
102. Kössel H., Z. physiol. Chem., **340**, 210 (1965).
103. Moundrianakis E. N., Beer M., Biochim. Biophys. Acta, **95**, 23 (1965).
104. Hoffmann H. D., Müller W., Biochim. Biophys. Acta, **123**, 421 (1966).
105. Fischer H., Z. physiol. Chem., **69**, 69 (1909).
106. Albert A., Brown D. J., J. Chem. Soc., **1954**, 2060.
107. Kössel H., Doehring S., Z. physiol. Chem., **340**, 221 (1965).
108. Beer M., Moundrianakis E. N., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 48, 409 (1962).
109. Moundrianakis E. N., Beer M., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **53**, 564 (1965).
110. Erikson H., Beer M., Biochemistry, **6**, 2694 (1967).
111. Roberts J. J., Warwick G. P., Nature, **197**, 88 (1963); Int. J. Cancer, **1**, 107, 179 (1966).
112. Fox J. J., Miller N. C., Cushley R. J., Tetrahedron Letters, **1966**, 4927.
113. Friedman O. M., Nahapatra G. N., Dash B., Stevenson R., Biochim. Biophys. Acta, **103**, 286 (1965).
114. Miles H. T., J. Org. Chem., **26**, 4761 (1961).
115. Scheit K. H., Holý A., Biochim. Biophys. Acta, **149**, 344 (1967).
116. Furukawa Y., Kobayashi K., Kanai Y., Honjo M., Chem. Pharm. Bull., **13**, 1273 (1965).
117. Fox J. J., Wempen I., Adv. Carboh. Chem., **14**, 283 (1959).
118. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», М., 1966, стр. 29.
119. Garg H. G., J. Sci. Ind. Res., **25**, 404 (1966).
120. Scheit K. H., Tetrahedron Letters, **1967**, 113.
121. Ikehara M., Ueda T., Ikeda K., Chem. Pharm. Bull., **10**, 767 (1962).
122. Kikugawa K., Sato F., Tsuruo T., Imura M., Ukita T., Chem. Pharm. Bull., **16**, 1110 (1968).
123. Thomas H. J., Montgomery J. A., J. Med. Chem., **11**, 44 (1968).
124. Ofengand J., J. Biol. Chem., **242**, 5034 (1967).
125. Carbon J., David H., Biochemistry, **7**, 3851 (1968).
126. Reid B. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 627 (1968).
127. Saneyoshi M., Nishimura S., Biochim. Biophys. Acta, **145**, 208 (1967).
128. Saneyoshi M., Chihara G., Chem. Pharm. Bull., **15**, 909 (1967).
129. Fox J. J., Van Praag D., Wempen I., Doerr I. L., Cheong L., Knoll J. E., Eidinoff M. L., Bendich A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **81**, 178 (1959).
130. Lipsett M. N., J. Biol. Chem., **240**, 3975 (1965).
131. Lipsett M. N., Doctor B. P., J. Biol. Chem., **242**, 4072 (1967).
132. Lipsett M. N., J. Biol. Chem., **242**, 4067 (1967).
133. Uziel M., Biochem. Biophys. Res. Comm., **25**, 106 (1966).

134. Doerr I. L., Wempen I., Clarke D. A., Fox J. J., J. Org. Chem., 26, 3401 (1961).
135. Carbon J. A., Hung L., Jones D. S., Proc. Nat. Acad. Sci US, 53, 979 (1965).
136. Goehler B., Doi P. H., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 56, 1047 (1967).
137. Shapiro R., Cohen B. J. Shuey S. J., Maurer H., Biochemistry, 8, 238 (1969).
138. Hayes F. N., Hansbury E., Mitchell V. E., Ratlieff R. L., Williams D. L., Europ. J. Biochem., 6, 485 (1968).
139. Keith G., Ebel J. P., Biochim. Biophys. Acta, 166, 16 (1968).
140. Axelrod V. D., Feldman M. Ya., Chuguev I. I., Bayev A. A., Biochim. Biophys. Acta, 186, 33 (1969).
141. Cox R. A., Kanagalingam K., Biochem. J., 103, 749 (1967); 108, 599 (1968).
142. Fenwick M. L., Biochem. J., 107, 851 (1968).
143. Bourguignon M. F., Biochim. Biophys. Acta, 166, 242 (1968).
144. Броуде Н. Е., Будовский Э. И., Biochim. Biophys. Acta (in press)
145. Litt M., Biochemistry, 8, 3249 (1969).
146. Holý A., Coll. Czech. Chem. Comm., 33, 2245 (1968).
147. Shapiro R., Shuey S. J., Biochim. Biophys. Acta, 174, 403 (1969).
148. Holý A., Žemlička J., Coll. Czech. Chem. Comm., 34, 2449 (1969).
149. Pal B. C., Uziel M., Doherty D. G., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 91, 3634 (1969).
150. Hayatsu H., Yano M., Tetrahedron Letters, 1969, 755.
151. Ziff E. B., Fresco J. R., J. Am. Chem. Soc., 90, 7338 (1968).
152. Ziff E. B., Fresco J. R., Biochemistry, 8, 3242 (1969).
153. Pleiss M., Ochiai H., Cerutti P. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 34, 70 (1969).

ГЛАВА 7

РЕАКЦИИ РАСЩЕПЛЕНИЯ И ПЕРЕГРУППИРОВКИ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ЯДЕР ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

I. ВВЕДЕНИЕ

Под действием ряда реагентов гетероциклические ядра оснований нуклеиновых кислот (и их производных) могут претерпевать расщепление. В некоторых случаях такое раскрытие цикла является промежуточной стадией реакции, за которой следует замыкание его с участием иных, чем в первоначальном цикле, групп атомов, что в итоге приводит к перегруппировкам.

По типам реагентов и участкам оснований нуклеиновых кислот, атакуемым этими реагентами, реакции расщепления циклов и перегруппировки могут быть разделены на несколько больших групп. Ряд реакций происходит под действием нуклеофильных реагентов (обычно сильных оснований), атакующих наиболее электрофильные атомы углерода в ядрах оснований: С-2 и С-8 пуриновых и С-2 и С-4 — пиримидиновых производных. Другим типом превращений, характерным для пуриновых производных, является атака бифункциональными нуклеофильными реагентами (гидроксиламином, гидразином и его производными) атома С-4 и двойной связи С-5—С-6 (с присоединением по С-6), что приводит к расщеплению пиримидинового цикла. Третьим важным типом реакций, также специфичным для пиримидиновых производных, является атака окислительными электрофильными реагентами двойной связи С-5—С-6 в пиримидиновых соединениях с последующим расщеплением цикла в этом месте.

II. РЕАКЦИИ РАСЩЕПЛЕНИЯ И ПЕРЕГРУППИРОВКИ ЦИКЛОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НУКЛЕОФИЛЬНЫХ АГЕНТОВ

1. Расщепление имидазольного цикла в пуриновых производных

Расщепление имидазольного цикла в пуриновых нуклеозидах и нуклеотидах и в других 9-замещенных пуринах под действием оснований (обычно OH^-) происходит, вероятнее всего, за счет

нуклеофильной атаки по С-8 пуринового ядра и приводит к производным 5,6-диаминопиримидина.

I → II → III → IV

R, R′ и R″—атомы водорода или различные радикалы

Известно довольно значительное количество работ, в которых эти реакции исследовались на различных примерах [1–20].

Строение конечного продукта реакции зависит от природы производного пурина и условий проведения реакции. Если реакция протекает в достаточно мягких условиях, то удается выделить первично образующийся 6-аминозамещенный пиримидин II. В более жестких условиях соединения типа II дают с отщеплением муравьиной кислоты 6-аминопиримидин III. Если расщеплению подвергаются пуриновые нуклеозиды (но не 9-алкилпурины), то в достаточно жестких условиях может также произойти отщепление рибозильного остатка, и в этом случае конечным продуктом реакции оказывается 5,6-диаминопиримидин IV.

Скорость расщепления имидазольного цикла в пуриновых производных зависит от концентрации атакующих ионов гидроксила [1–3] (табл. 7.1). Такая зависимость дает основание считать, что атака OH^- по С-8 является стадией, определяющей скорость всего процесса.

Легкость расщепления имидазольного кольца в пуриновых нуклеозидах зависит от характера заместителей в ядре [10], влияющих на электрофильность атома С-8 (см. гл. 3). Производные пуринов, содержащие заместители, ионизующиеся в щелочной среде, например оксогруппы при С-2 и С-6, такие, как гуанозин, дезоксигуанозин, инозин, ксантозин и соответствующие основания, не претерпевают расщепления имидазольного цикла даже в весьма жестких условиях (1 н. КОН, 100 °С)[3] (см. табл. 7.1). Это объясняется, по-видимому, тем, что в ионизованной форме такие группировки при С-2 и С-6 представляют собой сильные электронодонорные

Таблица 7.1 **Расщепление имидазольного цикла в пуриновых нуклеозидах и нуклеотидах под действием нуклеофильных агентов**

$$\mathbf{V} \xrightarrow{OH^-} \mathbf{VI}$$

Исходное соединение V	R	R′	R″	R‴	Реагент	Температура реакции, °С	Время реакции, ч	Степень превращения в VI, %	Литература
Аденозин	NH_2	OH	H	H	1 н. KOH	100	1	28,5	*2, 3*
					0,3 н. KOH	100	1	11,0	*3*
					0,1 н. KOH	100	1	0,0	*3*
Дезоксиаденозин	NH_2	H	H	H	1 н. KOH	100	1	27,0	*3*
Аденозин-2′(3′)-фосфат	NH_2	OH или $OPO(OH)_2$	$PO(OH)_2$ или H	H	1 н. KOH	100	1	10,0	*3*
Дезоксиаденозин-5′-фосфат *	NH_2	H	H	$PO(OH)_2$	1 н. KOH	100	1	9,5	*3*
9-(β-*D*-Рибофуранозил)-пурин	H	OH	H	H	0,2 н. NaOH	24	24	100	*4*
6-Метил-9-(β-*D*-рибофуранозил)-пурин	CH_3	OH	H	H	0,2 н. NaOH	24	24	60	*5*

* Аденин, гуанин, гуанозин, дезоксигуанозин, гипоксантин, инозин, ксантин и ксантозин в аналогичных условиях обработки (1 н. KOH, 100° С 1 ч) не расщепляются [3].

заместители, понижающие электрофильный характер атома С-8.

R—атом водорода или различные радикалы

Другие электронодонорные заместители в пиримидиновом цикле пуринов, такие, как NH_2, CH_3, хотя и не подавляют реакцию расщепления имидазольного цикла, но заметно снижают ее скорость. Так, в ряду 6-замещенных пуриновых нуклеозидов легкость расщепления имидазольного цикла падает с усилением электронодонорных свойств заместителя при С-6[4, 5, 10]. 9-β-*D*-Рибофуранозилпурин (небуларин) и его 6-метил-, 6-метилтио- и 6-хлорпроизводные легко расщепляются при комнатной температуре под действием 0,2 н. NaOH, в то время как 6-аминопурины в этих условиях устойчивы[10].

С наибольшей легкостью имидазольный цикл расщепляется в 7-алкилгуанинах (табл. 7.2). Эти соединения раскрывают свой имидазольный цикл даже при pH, близких к нейтральному[7–9], что связано, по-видимому, с наличием в молекуле 7-алкилгуаниновых производных положительного заряда на атоме N-7, сильно повышающего электрофильность атома С-8 *.

R и R′—различные радикалы

Характер заместителя при N-7 в заметной степени влияет на легкость раскрытия имидазольного цикла; с усилением электроноакцепторных свойств заместителя расщепление облегчается. Так, в сравнимых условиях для различных 7-N-замещенных гуа-

* См. также[15, 16, 19]. Производные пуринов, ацилированные по N-1 и N-3, в щелочной среде претерпевают расщепление с раскрытием пиримидинового цикла (см. стр. 442).

Таблица 7.2. **Расщепление имидазольного цикла в 7,9-дизамещенных гуанинах под действием нуклеофильных агентов**

VII $\xrightarrow{OH^-}$ VIII

Исходное соединение VII	R	R'	Реагент	Температура реакции, °C	Время * реакции, ч	Степень превращения в VIII, %	Литература
7-Метил-9-этилгуанин	C_2H_5	CH_3	pH 12	37	(37,5)	—	1
7,9-Ди-(β-оксиэтил)-гуанин	$HOCH_2CH_2$	$HOCH_2CH_2$	pH 12	20	(2,3)	—	1
			Насыщенный раствор $Ba(OH)_2$	100	2	50	17
7,9-Ди-(морфолиноэтил)-гуанин	$O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2$	$O(CH_2CH_2)_2NCH_2CH_2$	Насыщенный раствор $Ba(OH)_2$	100	2	100	6
7-Метилгуанозин	β-*D*-Рибофуранозил-1'	CH_3	1 н. NaOH	37	0,5	100	7
			pH 10,2	20	(1,5)	—	1
7-Бензилгуанозин	β-*D*-Рибофуранозил-1'	$C_6H_5CH_2$	pH 9,5	37	(0,5)		8
7-Метилгуанозин-5'-метилфосфат	5'-Метилфосфо-β-*D*-рибофуранозил-1'	CH_3	pH 9	37	72	30	9
			pH 10	37	45	100	9
			pH 12	37	0,5	100	9
			2 н. NH_4OH	~20	2	100	9
7-Метилгуанозин	β-*D*-Рибофуранозил-1'	CH_3	14%-ный NH_4OH	~20	2	56,8	20

* В скобках указано время, за которое достигается превращение исходного соединения на 50%.

нозинов скорость реакции возрастает в ряду: этил- < метил- < бензил-[1,8].

В настоящее время трудно оценить влияние природы остатка сахара на легкость раскрытия имидазольного цикла в различных пуриновых нуклеозидах. Для производных аденина можно сделать вывод, что дезоксирибо- и рибонуклеозиды расщепляются примерно с одинаковой скоростью, а соответствующие нуклеотиды — заметно медленнее[3] (см. табл. 7.1).

Данные о расщеплении имидазольного цикла пуринов в составе ДНК, РНК и полинуклеотидов весьма немногочисленны. Отмечено, что при pH, близких к нейтральному, остатки 7-алкилгуанина в составе алкилированных РНК[7,11] и ДНК[6,12,13,18] не претерпевают (в отличие от соответствующих нуклеозидов) раскрытия имидазольного цикла. С остатками 7-N-$(HOCH_2CH_2SCH_2CH_2)$-гуанина в составе ДНК эта реакция идет с заметной скоростью лишь при pH 10, когда происходит денатурация ДНК[12]. При жесткой щелочной обработке ДНК (нагревание с 1 н. NaOH при 100 °C) из обычных пуриновых оснований расщепление имидазольного цикла претерпевают, по-видимому, лишь остатки аденина[14].

2. Раскрытие пиримидинового цикла в пуриновых производных *

Под действием ряда нуклеофильных агентов, атакующих атом C-2 пуринового ядра, происходит расщепление пиримидинового цикла (разрыв связи N-1—C-2). Эта реакция известна главным образом для 1- и 3-замещенных аденинов и гипоксантинов; она приводит к образованию 5-аминоимидазол-4-карбоксамидопроизводных X (если обработку проводить при достаточно мягких условиях, то удается проследить образование промежуточного формиламинопроизводного IX[39]):

IX X

R, R′ и R″ — различные радикалы

* Обзор — см. [21].

Условия протекания реакций этого типа определяются строением соответствующих пуриновых производных, главным образом характером заместителей при N-1 и N-3, влияющих на электрофильность атома C-2.

Производные инозина, замещенные по N-1, легко расщепляются под действием спиртовой щелочи[22–25] (табл. 7.3). В этом случае связь N-1—C-2, по-видимому, активирована за счет карбонильной группы при C-6, не способной к енолизации:

O, $CH_2C_6H_5$, N, N, N, N, $:OH^-$, R

R—остаток рибозы

Столь же легко протекает аналогичная реакция в ряду 1-N-замещенных производных 6-меркаптопурина[37, 38].

Еще легче (уже в слабощелочной среде) расщепляется пиримидиновый цикл в 1-N-алкиладенинах, однако в этом случае имидазольные производные типа IX возникают лишь как промежуточные продукты перегруппировки 1-N-алкиладенинов в 6-*экзо*-N-алкиладенины (стр. 450). Если же такая перегруппировка невозможна, как, например, для 6-экзо-N,N-диметил-1-N-метиладенина XI, то легко образуется имидазольное производное XII[29].

$N(CH_3)_2$, CH_3, N, N^+, N, N, H — XI

1 н. NaOH; 20 °C →

$N(CH_3)_2$, CH_3, N, N, N, N, CHO, H, H — XII

Расщепление пиримидинового цикла в 1-N-алкиладенинах происходит также при жесткой кислотной обработке последних* (табл. 7.4)[8, 26–28]. Роль кислоты здесь состоит, по-видимому, в протонировании аденинового ядра по N-3 или N-7 с образованием двухзарядного катиона (о возможности образования такой формы см. стр. 179), в котором атом C-2 настолько электрофилен, что

* В этих условиях N-гликозидные связи в соответствующих адениновых нуклеозидах и нуклеотидах расщепляются (см. стр. 487).

Таблица 7.3. **Расщепление пиримидинового цикла в 1-N-замещенных производных инозина под действием щелочных агентов (0,1—0,15 н.)**

$$\text{XIII} \xrightarrow{OH^-} \text{XIV}$$

Исходное соединение XIII	R	R′	R″	R‴	Реагент	Температура реакции, °C	Время реакции, ч	Литература
1-Бензилинозин	$C_6H_5CH_2$	H	H	H	NaOH в спирте	При кипячении	3	*22*
1-Тозилинозин	*n*-$CH_3C_6H_4SO_2$	H	H	H	NaOH в спирте	При кипячении	5,5	*23*
1-Метоксиметил-2′,3′-изопропилиденинозин-5′-ди-(*n*-нитрофенил)-фосфат	CH_3OCH_2	$-C(CH_3)_2-$		$PO(OC_6H_4NO_2\text{-}n)$	NaOH в спирте	При кипячении	*1*	*24*
1-(β-Карбоксиэтил)-инозин-5′-фосфат	CH_2CH_2COOH	H	H	$PO(OH)_2$	KOH	*100*	*0,5*	*25*

Таблица 7.4. **Расщепление пиримидинового цикла в аденине и его 1-N-замещенных производных под действием кислоты**

Таблица 7.4. **Расщепление пиримидинового цикла в аденине и его 1-N-замещенных производных под действием кислоты**

XV $\xrightarrow{H^+}$ XVI

(XV: HNR′, N, N, $\overset{+}{N}$–R, N–H; XVI: X, NHR, NH_2, N, N–H)

Исходное соединение XV	R	R′	X	Реагент	Температура реакции, °C	Время * реакции, *мин*	Степень превращения в XVI, %	Литература
Аденин	H	H	NH	6 н. HCl	150	120	100	*26*
1-Метиладенин	CH_3	H	NH	6 н. HCl 1 н. HCl	100 80	(158) (350)	— —	*27* *8*
1-Бензиладенин	$C_6H_5CH_2$	H	NH	1 н. HCl	80	(35)	—	*8*
Аденилянтарная кислота	H	$CH(COOH)CH_2COOH$	O	1 н. HCl	100	180	44	*28*

* В скобках указано время, за которое достигается превращение исходного соединения на 50%.

сравнительно легко подвергается атаке такого слабого нуклеофильного реагента, как вода.

R—алкильный радикал

В таких условиях раскрытие пиримидинового цикла претерпевает и сам аденин[26] (см. табл. 7.4). Заместители при N-1, обладающие электроноакцепторным характером, облегчают реакцию (например, 1-бензиладенин расщепляется легче 1-метиладенина[8]).

Другими производными аденина по N-1, которые претерпевают расщепление пиримидинового цикла как в щелочной, так и в кислой среде, являются N-окиси[30–34] (табл. 7.5). В этих соединениях атом С-2 и связь N-1—C-2 так же, как и в 1-алкиладенинах, активированы положительным зарядом на N-1. Например, для аденина:

В щелочной среде N-окиси аденозина и аденозинмонофосфатов превращаются в производные XVIII[32]. Раскрытие пиримидинового цикла в молекуле N-окисей аденина и 2,6-диаминопурина происходит также при нагревании их при 140 °C с уксусным ангидридом; 2-метиладенин в этих условиях не расщепляется[33]. Реакция протекает, по-видимому, за счет атаки ацетат-аниона по С-2 пурина и приводит к образованию производных XX.

$(CH_3CO)_2O$

XIX
($R=H$ или NH_2)

XX

Таблица 7.5. **Расщепление пиримидинового цикла в 1-N-окисях пуринов**

XVII → XVIII

Исходная N-окись XVII	R	R′	Реагент	Температура реакции, °C	Время реакции, *мин*	Степень превращения в XVIII, %	Литература
Аденина	NH_2	H	3 н. HCl 0,5 н. HCl	100 100	10 240	100 65	*30* *30*
6-Метилпурина	CH_3	H	2 н. HCl	100	4	100	*31*
Аденозина	NH_2	β-*D*-Рибофуранозил-1′	1 н. NaOH	85	45	100	*32*
Аденозин-3′-фосфата	NH_2	3′-Фосфо-β-*D*-рибофуранозил-1′	1 н. NaOH	85	45	100	*32*
Аденозин-5′-фосфата	NH_2	5′-Фосфо-β-*D*-рибофуранозил-1′	1 н. NaOH	85	45	100	*32*

Производные гипоксантина XXI[35] и гуанина XXIII[36] под действием оснований также способные претерпевать расщепление пиримидинового цикла:

XXI (N-$CH_2C_6H_5$, $CH_2C_6H_5$) —(0,1 н. NaOH в спирте)→ XXII (NH-$CH_2C_6H_5$, NH_2, $CH_2C_6H_5$)

XXIII (CH_3O_2S, $HOCH_2$, NH, NH_2, HO, OH) —($(CH_3)_3COH$ в $(CH_3)_2SO$ (30 °С, 40 ч))→ XXIV (CH_3O_2S, NH_2, NH_2, $HOCH_2$, HO, OH)

Производные 3-N-замещенных пуринов, подобно 1-N-замещенным, расщепляются в щелочной среде, как об этом свидетельствуют данные табл. 7.6. Из других соединений, не указанных в этой таблице, отметим расщепление аденинового циклонуклеозида XXVII[35, 39, 40] (см. также[21]).

XXVIII ($N(CH_3)_2$, HN=C, O=CH, H_2C, HN, O, C, O) ←(0,1 н. $Ba(OH)_2$ (~20 °С, 5 мин))— XXVII ($N(CH_3)_2$, H_2C, HN, O, C, O) —(0,1 н. NaOH (~20 °С, 20 ч))→ XXIX ($N(CH_3)_2$, HN=C, H, H_2C, HN, O, C, O)

Таблица 7.6. **Расщепление пиримидинового цикла в 3-N-замещенных пуринах под действием нуклеофильных агентов (при 100° С)**

NR'_2 … OH^- → … NH_2, NH … R″ R

XXV XXVI

Исходное соединение XXV	R	R′	R″	Реагент	Время реакции, ч	Степень превращения в XXVI, %	Литература
3-Метиладенин	CH_3	H	H	1 н. NaOH	2—4	Нет данных	*29*
3,9-Дибензил-6-*экзо*-N,N-диметиламинопурин	$C_6H_5CH_2$	CH_3	$C_6H_5CH_2$	0,15 н. NaOH	6	100	*35*

29 Зак 614

Однако 3-(β-диэтиламиноэтил)-аденин XXX оказался устойчивым к нагреванию[6] (100 °С, 1 *ч*) в 1,5 н. HCl или в 1 н. NaOH.

NH_2 ... $CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$

XXX

Для аденозина описано расщепление пиримидинового цикла в кислой среде в присутствии фруктозы и ионов меди[41], механизм реакции неизвестен.

Данные о расщеплении остатков 1-N- и 3-N-алкиладенинов в составе РНК, ДНК и других полинуклеотидов практически отсутствуют (об образовании подобных производных при алкилировании полинуклеотидов см. стр. 364). Отмечается, что при действии на полиадениловую кислоту диэтил-(β-хлорэтил)-амина в течение 48 *ч* при pH 7 и 37 °С с последующим кислотным гидролизом среди продуктов реакции обнаруживается производное имидазола XXXI:

NH, $CNHCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$, NH_2

XXXI

Выход 6,3% от содержания аденина в полимере[6].

3. Перегруппировка 1-N-алкиладениновых производных в 6-*экзо*-N-алкилсоединения

Различные производные 1-N-алкиладенинов (основания, нуклеозиды и нуклеотиды) в щелочной среде превращаются в соответствующие 6-*экзо*-N-алкилсоединения. Эта реакция по своему механизму сводится к перегруппировке Димрота[42], хорошо известной для целого ряда гетероциклических соединений, и протекает

через промежуточное раскрытие пиримидинового цикла за счет атаки гидроксил-ионом атома С-2 [4, 8, 49].

XXXII XXXIII

R—алкильный радикал,
R′—атом водорода, остаток углевода или углеводофосфата

Хотя для проведения этой реакции часто применяются достаточно жесткие условия — нагревание с едкими щелочами или аммиаком [8, 19, 27, 44, 46—48, 52—54] (табл. 7.7), — перегруппировка протекает с заметной скоростью при сравнительно невысоких значениях pH (8—9) и даже в нейтральной среде [1, 50]. Характер зависимости скорости перегруппировки 1-N-метиладенозина в 6-*экзо*-N-метиладенозин (рис. 7.1) указывает на то, что перегруппировке подвергается как заряженная XXXII ($R{=}CH_3$, R′ — остаток рибозы), так и нейтральная XXXVI формы соединения; нейтральная форма реагирует примерно на два порядка медленнее.

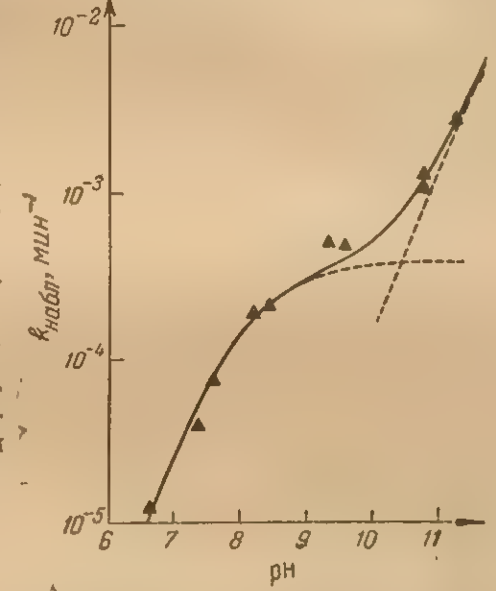


Рис. 7.1. Перегруппировка 1-N-метиладенозина в 6-*экзо*-N-метиладенозин. Зависимость наблюдаемой константы скорости первого порядка $k_{набл}$ от pH [50]

(пунктиром между pH 8 и 10 показан переход от протонированной к нейтральной форме реагирующего нуклеозида).

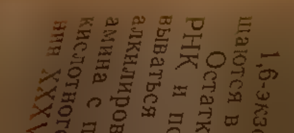
XXXVI
R—остаток рибозы

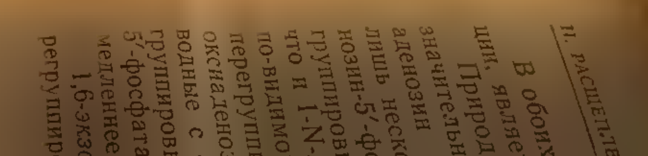
Таблица 7.7. **Перегруппировка производных 1-N-алкиладенина в 6-*экзо*-N-алкиладенины**

XXXII → XXXIII

Исходное соединение XXXII	R	R′	Реагент	Температура реакции, °C	Время * реакции, ч	Степень превращения в XXXIII, %	Литература
1,9-Диметиладенин	CH_3	CH_3	Вода	100	20	100	*43*
1-Бутил-9-метиладенин	*н*-C_4H_9	CH_3	Вода	100	20	100	*43*
1-Метиладенозин	CH_3	β-*D*-Рибофуранозил-1′	0,25 н. NaOH	100	1,25	100	*8*
			0,1 н. NaOH	37	(0,5)	—	*19*
1-Бензиладенозин	$C_6H_5CH_2$	β-*D*-Рибофуранозил-1′	0,1 н. NaOH	37	(0,33)	—	*19*
1-Метил-2′-дезоксиаденозин	CH_3	2′-Дезокси-(β-*D*-рибофуранозил)-1′	0,25 н. NaOH	100	0,5	100	*8*
1-Изопентениладенин	$(CH_3)_2C{=}CHCH_2$	H	1 н. NaOH	41	(33)	—	*44*
1-Изопентениладенозин	$(CH_3)_2C{=}CHCH_2$	β-*D*-Рибофуранозил-1′	pH 7,5	100	(1)	—	*45*
			0,02 н. KOH	41	(0,42)	—	*46*
			конц. NH_4OH	60	(0,67)	—	*47*
1-Изопентениладенозин-5′-фосфат	$(CH_3)_2C{=}CHCH_2$	5′-Фосфо-β-*D*-рибофуранозил-1′	конц. NH_4OH	60	(1)	—	*47*

* В скобках указано время, за которое достигается превращение исходного соединения на 50%





В обоих случаях стадией, определяющей общую скорость реакции, является, вероятно, атака гидроксил-анионом атома С-2.

Природа алкильного заместителя, по-видимому, оказывает незначительное влияние на скорость перегруппировки. 1-N-Бензиладенозин превращается в соответствующее 6-алкилпроизводное лишь несколько быстрее, чем 1-N-метиладенозин [19]. 1-N-Метиладенозин-5′-фосфат в широком интервале pH (от pH 7 до 12) перегруппировывается в 6-*экзо*-N-производное с той же скоростью, что и 1-N-этильный аналог [1]. Заместители в остатке сахара также, по-видимому, не оказывают значительного влияния на скорость перегруппировки. Так, 1-N-метиладенозин-5′-фосфат и 1-N-дезоксиаденозин-5′-фосфат превращаются в 6-*экзо*-метиламинопроизводные с одинаковой скоростью [1]; 1-N-изопентениладенозин перегруппировывается лишь немного быстрее соответствующего 5′-фосфата [47]. Соответствующие основания реагируют значительно медленнее и в более жестких условиях (см. табл. 7.7).

1,6-*экзо*-N-Диалкиладенозины также способны подвергаться перегруппировке Димрота [46], например:

XXXIV $\xrightarrow{OH^-}$ XXXV

1,6-*экзо*-N,N-Триалкиладенины под действием щелочи превращаются в производные имидазола (см. стр. 442) [29].

Остатки 1-алкиладенина, образующиеся при алкилировании РНК и полирибонуклеотидов (см. стр. 363), могут перегруппировываться в производные 6-*экзо*-N-алкиладенина уже в процессе алкилирования [6]. Так, из продуктов реакции (β-хлорэтил)-диэтиламина с полиадениловой кислотой (при pH 7 и 37 °C; 48 *ч*) после кислотного гидролиза был выделен 6-*экзо*-N-диэтиламиноэтиладенин XXXVII [6]

XXXVII

Поскольку остатки 1-алкиладенинов встречаются в качестве минорных оснований в составе нуклеиновых кислот (см. стр. 57), следует учитывать возможность их превращения уже в слабощелочной среде в 6-*экзо*-N-алкилпроизводные, так как это может привести к ошибкам в определении нуклеотидного состава.

Перегруппировка Димрота, по-видимому, лежит также в основе недавно открытой реакции превращения 6-*экзо*-N-(α-аминоацил)-аденинов в N-(пуринил-6)-α-аминокислоты [51, 150], протекающей уже в нейтральных водных растворах. Например, после кипячения 6-*экзо*-N-глициладенина XXXVIII в воде в течение 36 *ч* был обнаружен пуринил-6-глицин XXXIX (выход 30%). Кроме того, были найдены аденин и продукты расщепления пиримидинового цикла в аденине — замещенные имидазолы XL и XLI.

XXXVIII

XXXIX

XL

XLI

4. Расщепление и перегруппировки цикла в пиримидиновых производных

Пиримидиновый цикл в составе обычных пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов довольно устойчив к действию щелочей, однако при достаточно жесткой щелочной обработке (1 н. KOH, 100 °C) происходит его расщепление[55] (табл. 7.8). Реакция начинается, вероятно, с атаки гидроксил-иона по атому C-4 пиримидинового ядра, однако, поскольку первичные продукты быстро претерпевают дальнейшую деструкцию, из продуктов превращения были идентифицированы лишь мочевина и аммиак[55]. Пиримидиновые основания в этих условиях устойчивы[55].

Таблица 7.8. **Расщепление пиримидинового ядра в нуклеозидах и нуклеотидах под действием 1 н. раствора KOH (при 100° C)**[55]

Исходное соединение	Время реакции, ч	Содержание в продукте исходного соединения, %	Исходное соединение	Время реакции, ч	Содержание в продукте исходного соединения, %
Уридин	1	95	Цитидин-2′(3′)-фосфат	1	90 *
	5,5	58	Цитидин	1	96 *
Уридин-2′(3′)-фосфат	1	89	Дезоксицитидин	1	96 *
	5,5	57	5-Метилдезоксицитидин	1	100 *
Дезоксицитидин-5′-фосфат	1	93 *			

* В условиях реакции производные цитозина на 60—80% дезаминируются, превращаясь в соответствующие урацильные соединения.

Наличие в молекуле уридина при атоме N-3 алкильного заместителя в заметной степени облегчает раскрытие пиримидинового цикла под действием щелочей[56, 57]. Нестойки в щелочной среде и другие 1,3-дизамещенные урацильные производные[59—67]. Строение продуктов щелочного расщепления неизвестно, отмечено лишь, что при этом образуются производные мочевины[56]. 3-N-Алкилцитидины в противоположность 3-N-алкилуридинам довольно устойчивы к действию щелочей[1, 62]. Сравнительно легко (0,3 н. KOH, 40° C, 30 *ч*) расщепляется пиримидиновый цикл в молекуле N-3-окиси цитидина XLII[63].

XLII → XLIII —(H⁺)→ Неидентифицированные продукты

R—остаток рибозы

Предполагается, что ион гидроксила атакует атом С-2, активированный положительным зарядом на атоме N-3 цитозинового ядра. Последующая кислотная обработка ациклического производного (предполагаемое строение XLIII) приводит к расщеплению гликозидной связи [63] (о применении реакций этого типа см. стр. 575).

Расщепление пиримидинового цикла в щелочной среде легче всего происходит после гидрирования двойной связи С-5—С-6 (см. гл. 5) [56, 64–67, 151]. Дигидроуридин (и его 5′-фосфат) под действием разбавленного (0,01—0,1 н.) раствора щелочи при комнатной температуре превращается [64] в рибозильное производное уреидопропионовой кислоты XLIV *:

XLIV

Изучение кинетики этой реакции ** для ряда дигидропиримидинов [56, 65–67, 151] показало, что 3-N-алкилдигидропиримидины расщепляются под действием щелочей значительно быстрее производных, не содержащих заместителей при N-3 [56], а производные тимина — заметно медленнее производных урацила [56, 65, 67] (табл. 7.9). Дигидропиримидиновые нуклеозиды реагируют заметно быстрее дигидропиримидиновых оснований [56], хотя имеются данные, что скорости реакций оснований и нуклеозидов равны [65].

Насыщение двойной связи С-5—С-6, протекающее при галоидировании пиримидиновых производных (см. стр. 330), также приводит к соединениям, расщепляющимся с раскрытием цикла в щелочной среде [69, 70]. Образующиеся при этом ациклические продукты охарактеризованы не были. Образование ациклических производных цитозина и частично тимина происходит, по-видимому, и при обработке ДНК иодом (pH 5,3; 100 °С, 5 *мин*) с последующим действием 1 н. раствором NaOH (100 °С, 1 *ч*) [71].

Изучено расщепление пиримидинового цикла в 5-галоидзамещенных производных урацила и изоцитозина [72–76, 152]. При обра-

---

* Аналогичное раскрытие цикла наблюдается при восстановлении уридина натрийборгидридом при pH 9,5—10 и облучении светом ртутной лампы низкого давления [68] (см. гл. 12). Продуктом реакции является рибозильное производное уреидоспирта, получающееся в результате дальнейшего восстановления.

** Детальное изучение кинетики щелочного гидролиза урацила, тимина и 3-N-метилурацила — см. [151].

ботке 1-(β-*D*-арабинофуранозил)-5-фторуридина XLVI 0,1 н. NaOH (60—70 °C, 30 *мин*) образуется ациклическое производное 2′,2-циклонуклеозида XLVIII[76]. При более жесткой щелочной обработке (1 н. NaOH, 60 °C, 20 *ч*) соединение XLVIII дает производное имидазола XLIX[73, 76]:

XLVI → XLVII → XLVIII → XLIX

Раскрытие цикла происходит, по-видимому, за счет нуклеофильной атаки по C-4 в промежуточно образующемся дигидропиримидиновом циклонуклеозиде XLVII[73, 76].

Аналогичная перегруппировка в имидазольный нуклеозид LI описана для 2′,3′-O-изопропилиден-5-бромуридина L[75]:

L —(0,1 н. NaOH; 100 °C, 6 ч)→ LI

Таблица 7.9. **Расщепление пиримидинового цикла в производных дигидропиримидинов под действием 0,1 н. раствора щелочи**

Исходное 5,6-дигидропроизводное	Температура реакции, °C	Время полупревращения, *мин*	Литература
Урацила	22	3,7	56
	27—29	2,5	65
	18 *	5,0	67
1-Метилурацила	22	15	56
3-Метилурацила	22	Очень быстро	56
1,3-Диметилурацила	22	2,1	56
5-Метилурацила (тимина)	22	6,1	56
	27—29	7,0	65
	18	10,0	67
1,3,5-Триметилурацила	22	14,5	56
1,3,6-Триметилурацила	22	>1 *ч*	56
Уридина	22	4,8	56
	27—29	2,5	65
3-Метилуридина	22	<1	56
Уридин-2'(3')-фосфата	22	6,5	56
Тимидина	22	8,4	56
	27—29	7,0	65
3-Метилтимидина	22	<1	56
Тимидин-5'-фосфата	22	19,0	56

* Использовался 0,01 н. раствор щелочи.

Ряд производных цитозина способен подвергаться перегруппировке Димрота[42] (о перегруппировках этого типа в ряду пуринов см. стр. 450) *. Сам цитозин претерпевает такую перегруппировку при длительном (108 *ч*) кипячении в уксусном ангидриде[80], как это было показано с помощью меченых атомов:

$^{15}NH_2$ (цитозин, N—H, =O) → NHCOCH$_3$ (^{15}N в цикле, N—H, O=) + ^{15}NHCOCH$_3$ (N, N—H, =O)

Реакция протекает с промежуточным раскрытием пиримидинового цикла[80], по-видимому, за счет нуклеофильной атаки ацетат-

* В ряду пиримидинов перегруппировка Димрота детально изучена для неприродных 2-иминопиримидиновых производных[49, 77—79].

анионом по С-2. В аналогичных условиях 4-*экзо*-N-метилцитозин LIII превращается в 3-N-метилцитозин LIII[81]:

HNCH$_3$ ... OCOCH$_3$ $\xrightarrow{(CH_3CO)_2O}$ NCOCH$_3$, CH$_3$

LII LIII

Эта реакция представляет собой «обратную перегруппировку Димрота». Соответствующая «прямая перегруппировка», описанная для 1-N-метил-3-(β-оксиэтил)-цитозина LIV, протекает при нагревании с 1 н. NaOH (95 °C, 15 *мин*)[82]:

NH, CH$_2$CH$_2$OH, CH$_3$ $\longrightarrow$ NHCH$_2$CH$_2$OH, CH$_3$

LIV LV

Интересно отметить, что 3-N-метилцитидин в этих условиях не подвергается перегруппировке, а только дезаминируется[1, 62].

III. РАСЩЕПЛЕНИЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИДРАЗИНА

Мономерные компоненты нуклеиновых кислот. Выше уже рассматривалась (см. стр. 349) реакция гидразина в нейтральных или слабокислых водных растворах с цитозином и его производными, приводящая к замещению экзоциклической аминогруппы. При проведении реакции в щелочной среде[83–88] или с безводным гидразином[86, 89, 90] взаимодействие с компонентами нуклеиновых кислот сопровождается расщеплением пиримидинового цикла. Гуаниновое ядро под действием гидразина не разрушается[86, 93]. Данные относительно ядра аденина противоречивы. По одним из них оно не разрушается даже в таких жестких условиях, как действие безводного гидразина при 60 °C в течение 20 *ч*[86, 89, 90, 91] (ДНК фага ФХ174)[94]; согласно другим — гидразин разрушает адениновое ядро, хотя и в меньшей степени, чем пиримидиновое[93, 95, 96, 106]. Так, при обработке безводным гидразином дезоксиаденозин-5′-фосфата при 60 °C в течение 20 *ч* наблюдается разрушение нуклеотида на 50%[93]. Более детально взаимодействие гидразина с ядром аденина пока не исследовано.

При расщеплении производных урацила [91, 92] в качестве конечных продуктов реакции образуются мочевина и пиразолинон-5 LVII (R′ = H), а в случае производных тимина — соответственно 4-метилпиразолинон-5 LVII (R′ = CH_3) [91, 92]:

R — атом водорода или различные радикалы
R′ = H или CH_3

Производные цитозина [91, 92] расщепляются гидразином с образованием мочевины и 5-аминопиразола LIX; кроме того, был обнаружен еще один продукт LX [96, 106], выход которого увеличивается при переходе от цитозина к его нуклеозидам и нуклеотидам [106]. Это соединение, по-видимому, представляет собой 3-уреидопиразол [96], хотя ему приписывалась также структура N,N′-ди-(пиразолил-3)-гидразина [106].

R — атом водорода или различные радикалы

Образование продуктов LVII и LIX, вероятно, происходит в результате отщепления мочевины от промежуточных 3-уреидопиразолидинов LVI и LVIII. В случае реакции пиримидиновых производных с самим гидразином такие промежуточные продукты выделены не были, однако их выделение и идентификация при реакциях с метилзамещенными гидразинами [91, 92] (стр. 463) дает основание считать, что они образуются и в первом случае.

Если в реакции участвуют нуклеозиды или нуклеотиды, то образующиеся после отщепления пиразолина N-рибозил- или N-дезоксирибозилмочевины могут вступать в обменную реакцию с избытком гидразина в реакционной смеси, давая рибозил- или дезоксирибозилгидразоны LXI и незамещенную мочевину[86, 106].

HOCH₂ … NHCONH₂ $\xrightarrow[-NH_2CONH_2]{NH_2NH_2}$ HOCH₂ … NHNH₂ ⇄ HOCH₂ … OH, CH=N—NH₂ (HO, R)

LXI

R= H или OH

При взаимодействии безводного гидразина с различными нуклеотидами и нуклеозидами[86, 89, 90] наиболее реакционноспособными оказываются производные урацила; значительно менее реакционноспособны производные цитозина и наименьшая активность наблюдается в случае производных тимина и псевдоуридина (рис. 7.2). Во всех изученных примерах кинетика реакции подчиняется уравнению первого порядка[86, 89]. Аналогичные закономерности получены также при использовании гидразингидрата[84, 85, 106] и водных растворов гидразина[4–6, 24] с тем значением pH, которое создавалось самим гидразином при используемой концентрации (табл. 7.10).

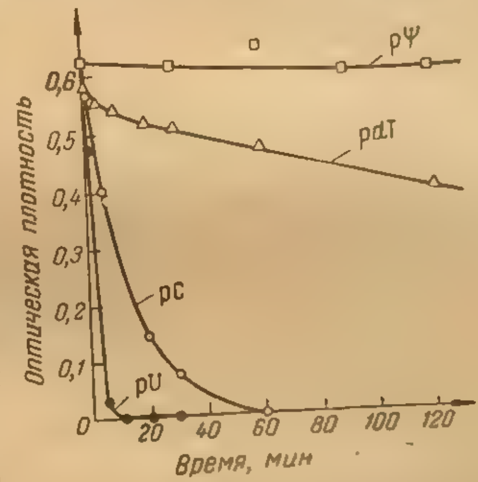


Рис. 7.2. Кинетика модификации ряда нуклеотидов безводным гидразином при 37° C[89].

В случае pΨ измерения проводились при pH 12, в остальных случаях — при pH 2,0, для pU и pdT показано изменение оптической плотности при 260 *ммк*, для pC — при 286 *ммк*, для pΨ — при 290 *ммк*.

При реакции уридина с водными растворами гидразина, имеющими различное значение pH, максимальная скорость реакции наблюдается при pH 10,5[88]. Наличие оптимума pH, по-видимому, свидетельствует о том, что реакция протекает между нейтральными молекулами уридина и гидразина. При повышении pH образующийся анион урацила реагирует с гидразином с меньшей скоростью, чем нейтральная молекула, тогда как при понижении pH скорость уменьшается за счет протонирования гидразина. Из подобных соображений следует, что оптимальное значение pH должно наблюдаться также для производных тимина, однако соответствующих экспериментальных подтверждений пока не получено. Известно лишь, что скорость реакции

Таблица 7.10. **Кинетика гидразинолиза оснований, нуклеозидов и нуклеотидов гидразингидратом при 90° С в присутствии воды** [106]

Соединение	Время полупревращения, *мин*	Время, необходимое для полного завершения реакции, *мин*
Урацил	4	30
Уридин	<1	10
Дезоксиуридин	<1	20
Уридин-2′(3′)-фосфат	~ 1	10
Уридин-5′-фосфат	<1	5
Цитозин	20	180
Цитидин	4	25
Дезоксицитидин	8	50
Цитидин-2′(3′)-фосфат	~ 1	25
Дезоксицитидин-5′-фосфат	6	25
Тимин	55	250
Тимидин	12	80
Тимидин-5′-фосфат	8	55
Аценозин-2′(3′)-фосфат	210	—
Дезоксиаденозин-5′-фосфат	360	—

Примечание. Для аденозина за 4 *ч* в спектре реакционной смеси не наблюдается каких-либо изменений; для гуанозина и его нуклеотидов спектр реакционной смеси через 6 *ч* остается неизмененным.

производных тимина с гидразином (10 *М* раствор реагента, 60° С, 4 *ч*) возрастает[86, 87] при увеличении pH от 6 до 10:

pH	Степень модификации, % для pdT	Степень модификации, % для pdC
6	42	76
8	70	89
10	77	97

Поскольку цитозиновое ядро теряет протон, по-видимому, только в сильно щелочных условиях, то при реакции с гидразином производных цитозина оптимум pH (если он имеется) должен быть сдвинут в щелочную область по сравнению с производными урацила и тимина. Однако и в этом случае нет соответствующих экспериментальных данных и наблюдается только возрастание скорости модификации при увеличении pH от 6 до 10. В данном интервале pH сохраняется та же закономерность в скорости модификации оснований гидразином, что и при использовании безводного гидразина, а именно[86, 87]:

Производные урацила > Производные цитозина > Производные тимина

Этот ряд реакционной способности взаимодействия пиримидиновых производных с гидразином не меняется при изменении тем-

пературы, хотя абсолютные скорости реакции, естественно, увеличиваются с ее повышением [86, 87]:

	Температура, °C	Время полупревращения (безводный гидразин) *мин*
Дезоксицитидин-5′-фосфат . .	60	14
	40	50
Тимидин-5′-фосфат	60	35
	40	143

Сопоставление скорости реакции с безводным гидразином и с его водными растворами показывает, что даже при оптимальных значениях pH водные растворы гидразина модифицируют нуклеозиды медленнее, чем безводный гидразин. Так, при 60° C безводный гидразин полностью разрушает дезоксицитидин-5′-фосфат за 90 *мин*, а тимидин-5′-фосфат — за 4 *ч*, тогда как при обработке 10 *М* водным раствором гидразина при pH 10 через 4 *ч* в реакционной смеси остается еще 3% дезоксицитидин-5′- и 23% тимидин-5′-фосфатов [87]. Такое различие в действии реагентов не удивительно, поскольку концентрации водных растворов существенно ниже «концентрации» безводного гидразина.

Приведенные данные показывают, что гидразин является малоспецифическим агентом; с довольно близкими скоростями он модифицирует как цитозиновое, так и урацильное ядро, хотя производные урацила реагируют заметно быстрее [90]. Специфичность реакции несколько повышается при использовании метил- и 1,2-диметилгидразинов [88], однако при введении в молекулу гидразина метильных групп скорость модификации пиримидиновых производных понижается [86, 88]. Так, константы скорости первого порядка реакции уридина в 6,5 *М* водных растворах гидразина, метилгидразина и 1,2-диметилгидразина при 37° C и pH 10,5 равны [88] соответственно $2{,}4 \cdot 10^{-4}$; $1{,}4 \cdot 10^{-4}$ и $2 \cdot 10^{-5}$ *сек*$^{-1}$. Производные тимина реагируют с водными растворами замещенных гидразинов [88]; с безводными метилгидразином и фенилгидразином за 6 *ч* при 60 °C не удалось обнаружить заметной деградации гетероциклического ядра [86].

При реакции урацила с моно- и 1,2-диметилзамещенными гидразинами образуются 1-метилпиразолинон-5 LXII и 1,2-диметилпиразолинон-5 LXIII соответственно [91, 92]:

LXII LXIII

В обоих случаях удается выделить также промежуточные 3-уреидозамещенные пиразолидиноны, причем устойчивость 1,2-ди-

метил-3-уреидопиразолидинона-5 выше, чем 1-метил-3-уреидопиразолидинона-5. По-видимому, такие же продукты должны образовываться при соответствующих реакциях нуклеозидов и нуклеотидов.

Исследование относительной скорости модификации оснований нуклеозидов и нуклеотидов под действием водных растворов гидразина [106] приводит к заключению, что основания менее реакционноспособны, чем нуклеозиды, которые, в свою очередь, менее реакционноспособны по сравнению с нуклеотидами; производные рибозы более реакционноспособны, чем дезоксирибопиримидины (см. табл. 7.10).

Такая закономерность понятна с точки зрения легкости ионизации соответствующих соединений (см. стр. 177). Соединения, наиболее легко отдающие протон в щелочной среде, реагируют с наименьшей скоростью.

Реакция гидразина с пиримидиновыми производными является последовательной нуклеофильной реакцией, механизм которой может быть представлен двумя альтернативными (или взаимодополняющими) схемами:

R—атом водорода или различные радикалы

Выбор между этими двумя путями реакции в настоящее время не может быть сделан из-за отсутствия достаточного количества экспериментальных данных.

Полинуклеотиды. Получение апиримидиновых полимеров. Гидразинолиз полинуклеотидов обычно проводят, используя безводный гидразин [86, 89, 90, 93–104], чтобы избежать расщепления фосфодиэфирных связей в щелочной среде [98, 99]. Тем не менее проведение реакции с водными растворами гидразина при контролируемых значениях pH [87] дает аналогичные результаты (см. ниже).

При обработке ДНК безводным гидразином в достаточно мягких условиях (3—4 *ч* при 60° C [86, 90, 93, 96, 100–104] или 20 *ч* при

37 °С [93, 95]) происходит полная деструкция цитозинового и тиминового ядер (табл. 7.11) при незначительном разрушении аденинового ядра. Уменьшение времени обработки приводит к неполному разрушению тиминовых производных [90, 93, 95–97, 99]; напротив, увеличение времени реакции может, по-видимому, вызвать существенную деградацию аденина [93, 95, 96]. Данные по разрушению аденина в составе ДНК противоречивы (см. стр. 459), однако даже по самым высоким оценкам [93] за 4 *ч* при 60° С или за 20 *ч* при 37° С разрушается не более 10% адениновых ядер в ДНК, так что существует возможность достаточно селективного разрушения пиримидиновых ядер в полимере с получением апиримидиновых ДНК.

Таблица 7.11. **Разрушение пиримидиновых ядер в составе ДНК под действием безводного гидразина [93]**

Время реакции, ч	Разложилось цитозина, %		Разложилось тимина, %	
	при 37° С	при 60° С	при 37° С	при 60° С
0	0	0	0	0
2	78	100	28	85
4	85	100	65	100
8	98	100	90	100
16	100	100	100	100

В случае РНК, содержащей более реакционноспособные (по сравнению с тимином) урацильные ядра, полное разрушение урацила и цитозина в составе полимера происходит значительно скорее. Так, после обработки тРНК безводным гидразином при 50 °С в течение 1 *ч* [98] или при 37 °С в течение 1,5 *ч* [89] не удается обнаружить в ее составе ни урацила, ни цитозина. Остатки малореакционноспособных рибозилтимина и 5-рибозилурацила при этом модифицируются, по-видимому, лишь в незначительной степени [89].

Реакция пиримидиновых оснований в составе нуклеиновых кислот, вероятно, протекает по той же схеме, что и реакция оснований в составе нуклеозидов (см. стр. 466).

Остаток цитозина в ДНК так же, как и в случае мономерных компонентов, дает наряду с 3-аминопиразолом 3-уреидопиразол, который обнаруживается в низкомолекулярных продуктах реакции [96]. Образующиеся в составе полимера на последней стадии гидразоны могут существовать в циклической LXVI и ациклической LXVII таутомерных формах [105]. В открытой форме LXVII имеется возможность β-элиминации фосфатной группы из 3′-положения остатка сахара и, кроме того, в водной среде возможен гидролиз связи 5′-CH_2O—Р, рядом с которой в 4′-положении углевода находится гидроксильная группа (см. стр. 561). Вследствие этого в процессе гидразинолиза даже с безводным гидразином происходит

Взаимодействие нуклеиновых кислот с гидразином.

$\xrightarrow{NH_2NH_2}$ LXIV $\longrightarrow$ LXV $\xrightarrow{NH_2NH_2}$

$\longrightarrow$ LXVI $\rightleftarrows$ LXVII $\xrightarrow{C_6H_5CHO}$ LXVIII

R = H или OH, соответственно R′ = CH_3 или H

заметная деградация олигонуклеотидной цепи, хотя и получаются довольно высокомолекулярные фрагменты. Так, после обработки ДНК мол. веса $6 \cdot 10^6$ безводным гидразином при 60 °C в течение 55 *мин*[99] получается набор апиримидиновых фрагментов со средним молекулярным весом примерно $5 \cdot 10^3$. Особенно сильно идет деградация в водных растворах гидразина[98]. Однако если проводить гидразинолиз при достаточно низких значениях pH и низкой температуре, то удается выделить довольно высокомолекулярную апиримидиновую ДНК. Это было показано на примере гидразинолиза ДНК фага T_2 при pH 9,5 и 0 °C, проводившегося в течение 10 суток[87]. В продуктах реакции не было обнаружено пиримидинов, а константа седиментации полученной апиримидиновой ДНК мало отличалась от константы седиментации исходной ДНК. Продукт модификации седиментировал узкой, неразмытой зоной, что свидетельствует о малой деградации полинуклеотидной цепи.

Из полученной апиримидиновой кислоты действием альдегидов (например, бензальдегида) могут быть удалены остатки гидразина, и в конечном счете на месте пиримидинового нуклеотида в полинуклеотидной цепи оказывается негликозилированный рибозильный остаток, фосфодиэфирные связи которого очень лабильны и могут быть расщеплены в мягких условиях (см. стр. 581). Апиримидиновые нуклеиновые кислоты вследствие этого легко могут быть расщеплены до олигопуриновых нуклеотидов, и это широко применяется при анализе распределения пуринов в ДНК и РНК (см. стр. 583). Следует отметить, что образующиеся под действием гидразина апиримидиновые ДНК при обработке дифениламином и муравьиной кислотой (см. стр. 574) неколичественно выделяют неорганический фосфор и показывают заниженные отношения дезоксирибозы (по реакции с дифениламином) к фосфору. Это свидетельствует о том, что пиримидиннуклеозидные звенья (по-видимому, цитидиновые) не превращаются количественно в гидразоны, которые в дальнейшем обработкой бензальдегидом могут быть превращены в свободные дезоксирибозильные звенья[96]. При реакции с цитозиновыми звеньями даже в щелочной среде наряду с расщеплением цикла наблюдается замещение аминогруппы цитозина на группу $NHNH_2$[92]. Образующийся при этом 4-*экзо*-N-аминоцитозин может оказаться значительно более устойчивым к расщеплению. Тем не менее, расхождения экспериментальных значений с предсказываемыми теоретически для полностью апиридиновой ДНК не очень велики.

IV. РАСЩЕПЛЕНИЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИДРОКСИЛАМИНА

Мономерные компоненты нуклеиновых кислот. Аналогично гидразину, но более специфично реагирует в щелочной среде гидроксиламин, если его концентрация достаточно велика. Реакция гидро-

ксиламина с цитозиновым ядром была уже рассмотрена выше (см. стр. 343); она имеет максимальную скорость при pH 6—6,2. По мере повышения pH скорость этой реакции падает. Напротив, скорость расщепления урацильного ядра в уридине и его нуклеотидах [107-110] с повышением pH увеличивается, о чем можно судить, например, по уменьшению оптической плотности растворов нуклеозид-2'(3')-фосфатов в УФ-области спектра (рис. 7.3). Согласно этому критерию пуриновые нуклеозиды, а также тимидин и псевдоуридин [107] при действии гидроксиламина в широком интервале значений pH (6—12) не разрушаются или разрушаются очень медленно.

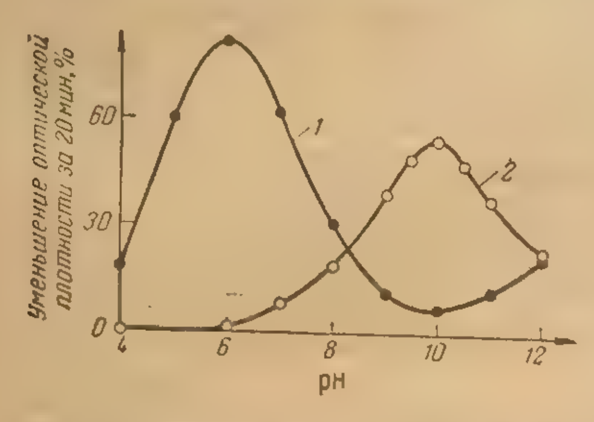


Рис. 7.3. Реакция цитидин-2'(3')-фосфата (кривая 1) и уридин-2'(3')-фосфата (кривая 2) с гидроксиламином. Зависимость изменения оптической плотности растворов нуклеотидов от pH[107, 108].

(кривая 1 — изменение оптической плотности при 280 ммк; кривая 2 — при 260 ммк, концентрация реагента 6,5 М, 37° С).

Скорость расщепления урацильного ядра максимальна при pH 10, при дальнейшем возрастании pH скорость реакции уменьшается [107, 108] (см. рис. 7.3). Расщепление цикла представляет собой реакцию второго порядка, которая, поскольку обычно используются большие избытки гидроксиламина, может быть приближенно представлена как реакция первого порядка по уридину со скоростью; пропорциональной концентрации гидроксиламина в реакционной среде. При pH 10 для 10 М раствора гидроксиламина величина константы скорости реакции расщепления составляет примерно 1 $ч^{-1}$ (при 37 °С) [110]. Скорость модификации цитозинового ядра в этих условиях значительно ниже [108, 111]; к моменту, когда с 6 М раствором гидроксиламина реагирует 95% уридина, цитидин модифицируется [107] всего лишь примерно на 8% *. Таким образом, при pH 10 (в сравнительно мягких условиях) реакция с гидроксиламином довольно специфична по отношению к уридину (из обычных нуклеозидов). Конечными продуктами реакции уридина и его фосфатов с гидроксиламином является оксазолон-5 LXX (аналог пиразолона-5) и оксим рибозы LXXI или рибозофосфата, получающийся из промежуточно образующейся рибозилмочевины за счет обменной реакции с гидроксиламином [107-109]. Реакция протекает, вероятно, по механизму, аналогичному реакции с гидразином, и

* Следует отметить, что реакция с гидроксиламином подвержена каталитическим влияниям, природа которых в настоящее время еще не ясна. Вследствие этих эффектов модификация цитидина в ряде случаев может быть значительной.

включает следующие стадии:

NH_2OH — LXIX — $RNHCONH_2$ + — LXX

R—остаток рибозы или рибозо-5′-фосфата

$R'OCH_2$ — $NHCONH_2$ — NH_2OH / $-NH_2CONH_2$ — $R'OCH_2$ — NHOH — $R'OCH_2$ — NOH — LXXI

R′ = H или PO_3H_2

Первой стадией реакции является присоединение аминогруппы гидроксиламина по двойной связи С-5—С-6 урацильного ядра; оптимум pH ≈ 8[153].

Сравнительных данных по кинетике реакции нуклеозидов и нуклеотидов с гидроксиламином пока не имеется. Известно, однако, что урацил реагирует значительно медленнее уридина[107]; это связано, по-видимому, как с различными значениями pK_a оснований, так и с облегчением нуклеофильной атаки при наличии в нейтральном ядре такого электроноакцепторного заместителя как рибоза; уридин-5′-фосфат и уридин-5′-дифосфат, судя по уменьшению оптической плотности растворов, реагируют при pH 10 практически с одинаковой скоростью, в то время как скорость реакции уридин-5′-дифосфатглюкозы значительно ниже[112]. Эта разница в скорости увеличивается с повышением температуры, и при 90° С отношение констант скорости реакции первых двух соединений к скорости реакции уридиндифосфатглюкозы достигает величины 2,5. Аналогичные явления наблюдаются и для производных дезоксиуридина*. Возможной причиной наблюдаемых эффектов

* При pH 8 и низких температурах скорость уменьшения оптической плотности и скорость накопления продуктов расщепления цикла, по-видимому, не совпадают вследствие образования значительных количеств продуктов присоединения по двойной связи, не поглощающих в интервале 250—300 *ммк*[153]. Однако при высоких температурах эти скорости можно с достаточной степенью точности считать равными.

является существование определенного взаимодействия между остатком глюкозы и гетероциклическим основанием в нуклеозиддифосфатсахарах[113], вследствие чего реакция затрудняется. В связи с этим следует отметить, что скорости реакции 3-N-метилуридин-5′-фосфата и соответствующей уридиндифосфатглюкозы равны[112], так что, возможно, конформация молекулы незамещенной уридиндифосфатглюкозы стабилизована за счет водородной связи с участием протона N-3-урацильного остатка. Однако увеличение различия в скорости реакции с повышением температуры пока остается необъяснимым, хотя если в стабилизации конформации важную роль играют гидрофобные взаимодействия, которые усиливаются с температурой[114], то такого эффекта можно было бы ожидать.

Влияние заместителей в гетероциклическом ядре уридина на кинетику его реакции с гидроксиламином подробно не исследовано. Можно отметить лишь, что введение метильной группы в случае 3-N-метилуридина[112] и тимидина[107] приводит к уменьшению скорости реакции. Аналог уридина — изоцитидин реагирует так же, как и уридин, с образованием изоксазолона-5[107], однако подробных сведений об этой реакции нет.

Полинуклеотиды. Специфичность действия гидроксиламина и относительно мягкие условия реакции с ним дают возможность избирательно модифицировать урацильные ядра в составе рибополинуклеотидов и РНК[107, 111, 115–117]. Оптимальные условия модификации (pH 10, 10 *М* раствор реагента, 10° С, 150 *ч*) дают возможность полностью расщепить остатки урацила и заместить образующиеся остатки мочевины в соответствующих звеньях полинуклеотидной цепи на остатки гидроксиламина при незначительной модификации цитозиновых ядер (10—15%) *). Повышение температуры приводит к увеличению степени модификации цитозиновых звеньев и, по-видимому, к увеличению неспецифической деградации полинуклеотидной цепи. Понижение температуры до 0° С сильно замедляет расщепление урацильных звеньев. Сокращение времени реакции может привести к неполному замещению остатков мочевины в полинуклеотидной цепи, что усложняет задачу при необходимости получить полинуклеотид со свободными рибозильными звеньями (см. ниже). В приведенных оптимальных условиях неспецифическая деградация полинуклеотидной цепи минимальна, как это следует из незначительного уменьшения средней величины молекулярного веса поли-(А, С) и из того, что динуклеозидмонофосфат GpC в данных условиях не расщепляется[118]. Однако наблюдается довольно значительная специфическая деградация по звеньям, содержащим продукты расщепления урацильного ядра, о чем можно судить, например, по сильному уменьшению среднего значе-

---

* См. примечание на стр. 468.

ния молекулярного веса полиуридиловой кислоты в процессе модификации [118].

Это расщепление связано, по-видимому, с возможностью существования оксима рибозы в открытой таутомерной форме, в которой облегчена β-элиминация фосфатной группы из 3'-положения соответствующего углеводного остатка (см. стр. 583). В получающихся после реакции с гидроксиламином дезурацильных РНК остаток гидроксиламина, присоединенный к рибозофосфатной цепи, может быть удален гидролизом в слабокислой среде (pH 5) в присутствии циклогексанона [116, 117]. В результате образуется полимер, содержащий на месте уридиновых звеньев исходной РНК рибозильные звенья со свободным гликозидным центром. В присутствии катализаторов β-элиминации (см. стр. 584) может быть проведено специфическое расщепление такого полимера по свободным рибозильным остаткам и получены олигонуклеотидные блоки, соответствующие расщеплению исходной РНК по уридиновым звеньям. Специфичность подобного расщепления определяется степенью разрушения в процессе модификации других оснований, особенно цитозина. Следует иметь в виду, что гидроксиламин является реагентом, чувствительным ко вторичной структуре полинуклеотида [119, 120], так что модификация может привести к

расщеплению только тех уридиновых звеньев, которые находятся в петлевых участках рибонуклеиновых кислот. Так, например, при модификации полиуридиловой кислоты 10 *М* раствором гидроксиламина при pH 10 и 10° С расщепление остатков урацила заканчивается через 30 *ч*, а при обработке комплекса (поли-А) · (поли-U) — только через 70 *ч*[120]. При модификации тРНК[1,9] при 0° С реагировало всего 30% урацильных остатков, тогда как при 37° С или при 10° С, но в присутствии мочевины, разрушающей вторичную структуру, расщепление остатков урацила было полным[119]. Чувствительность реагента ко вторичной структуре дает в принципе возможность расщепления полинуклеотидов по уридиновым звеньям, находящимся в односпиральных участках.

ДНК не содержит оснований, достаточно реакционноспособных по отношению к гидроксиламину (при pH 10), однако реакцию все же удается провести после дезаминирования ДНК, осуществляемого, например, азотистой кислотой, в результате чего цитозиновые остатки превращаются в урацильные. Это дает возможность специфического расщепления ДНК на олигонуклеотидные блоки по месту нахождения в исходной цепи дезоксицитидиновых звеньев, что особенно ценно, поскольку пока не известны ферменты, гидролизующие ДНК достаточно специфично по отношению к какому-либо определенному нуклеотиду. Такое сочетание двух методов химической модификации (обработки азотистой кислотой и гидроксиламином) с последующим кислотным гидролизом было применено для изучения распределения в ДНК тимидина[121].

Особенности протекания реакции с гидроксиламином при низких концентрациях реагента. Если при достаточно высоких (более 0,1 *моль/л*) концентрациях гидроксиламин избирательно модифицирует урацильные ядра, то при концентрациях 10^{-1} — 10^{-2} *моль/л* в присутствии кислорода при pH 7—9 он неспецифически разрушает пиримидиновые основания и гуанин[122–125], модифицирует (без разрушения гетероцикла) аденин[122–123], давая два неидентифицированных продукта[123]. При действии на нуклеозиды и нуклеотиды гидроксиламин в малых концентрациях вызывает отщепление оснований[123], а при обработке олигонуклеотидов и ДНК — интенсивное расщепление полинуклеотидной цепи. Скорость такого рода реакций уменьшается при увеличении концентрации реагента, при удалении кислорода из реакционной смеси или при добавлении каталазы, пероксидазы, трилона В и пирофосфата[122, 125]. Продукты реакции нуклеотидов с гидроксиламином, по-видимому, идентичны продуктам, получающимся при действии перекиси водорода[123, 124], за исключением одного неидентифицированного продукта производного аденозина[123]. Вероятно, что неспецифические реакции в этих условиях протекают за счет атаки радикалами OH·, возникающими при окислении гидроксиламина. Разрушение полинуклеотидной цепи (так же как и при реакции с перекисью водо-

рода) вызывается, по-видимому, окислением атома С-1′ остатка дезоксирибозы [123, 154]. Подробнее этот вопрос рассмотрен на стр. 478.

V. РАСЩЕПЛЕНИЕ ЦИКЛОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРМАНГАНАТА КАЛИЯ И ЧЕТЫРЕХОКИСИ ОСМИЯ

Мономерные компоненты нуклеиновых кислот. Перманганат калия в водных растворах окисляет пиримидиновые основания и гуанин, не затрагивая аденин. Выше уже отмечалось (см. стр. 333), что первичными продуктами взаимодействия перманганата калия с пиримидиновыми основаниями являются, по-видимому, 5,6-диокси-5,6-дигидропроизводные, которые далее могут окисляться с образованием серии продуктов расщепления гетероциклического ядра.

При окислении перманганатом калия (0,03—0,05 *моль/л*) 1-метилтимина и 1-фенилтимина при 37° С в нейтральной и слабоосновной (pH 9) среде в качестве продуктов реакции были идентифицированы соответствующие N-замещенные мочевины, оксиацетон, пировиноградная и муравьиная кислоты [126]. Окисление в аналогичных условиях тимидина протекает по схеме [126, 127]:

H_3C, O, NH, N, O, R
O ‖ $H_2NCNHCHO$
O ‖ CH_3CCH_2OH
H_3C, HO, HO, O, NH, N, O, R — LXXII
H_3C, O, O, NH, OHC, N, O, R
H_3C, O, O, NH, H, N, O, R — LXXIII
H | CH_3COH | CHO
COOH | CH_3COH | CHO + $NH_2CONH—R$ → NH_2CONH_2
O ‖ $-CH_3CCOOH$

R — остаток дизоксирибозы

В продуктах реакции обнаружены 5,6-диокси-5,6-дигидротимидин LXXII [127], мочевина [127, 128], N-формилмочевина [127], N,N-дизамещенная мочевина LXXIII [127] и, возможно, N-дезоксирибозилмочевина [127, 128].

Окисление гликоля LXXII перманганатом приводило к той же серии продуктов [127].

Окисление урацила при pH 7 приводит к оксалуровой кислоте LXXV, аммиаку, мочевине, щавелевой и муравьиной кислотам [129]. Аналогично окисляются 1-алкил- и 1-арилзамещенные урацилы [129]. Окисление нуклеозидов и нуклеотидов урацила, по-видимому, происходит аналогично и дает те же продукты, хотя в этом случае пока идентифицированы только производные мочевины [128]. Окисление, очевидно, протекает с промежуточным образованием формилоксалуровой кислоты LXXIV и может быть представлено следующим образом: [129]

LXXIV

$\rightarrow$ $(COOH)_2 + NH_2CONH{-}R$

LXXV

R — атом водорода или различные радикалы

Производные цитозина окисляются с образованием тех же продуктов, однако помимо мочевины образуются еще производные биурета LXXVII. Отношение выходов производных мочевины и производных биурета в случае цитозина и 1-метилцитозина составляет [129] соответственно 1 : 1,5 и 1 : 1,2; при окислении цитидина и дезоксицитидина это отношение равно [128] соответственно 4 : 1 и 3 : 1. Возможно, что образующийся на первой стадии окисления диол LXXVI может распадаться по двум направлениям: путем непосредственного окисления с образованием производных биурета LXXVII и путем дезаминирования (см. стр. 353) с образованием производ-

ных урацила, которые затем окисляются обычным для этих соединений способом, давая производные мочевины [129]:

NH_2 → HO, NH_2, N, HO, N, O, R (LXXVI) → HO, O, NH, HO, N, O, R → $NH_2CONH—R$ + Другие продукты

LXXVI → $NH_2CONHCONH—R$ (LXXVII)

R — атом водорода или различные радикалы

При окислении гуанозина, дезоксигуанозина и их О-ацетильных (по остатку сахара) производных при pH 9 и 37° C образуются гуанидин, мочевина, рибоза или дезоксирибоза (или их ацетильные производные), а также рибозил- или дезоксирибозилмочевины (или их О-ацетильные производные) [128]. При окислении 2′,3′-О-изопропилиденгуанозина образуется щавелевая кислота. Кроме того, получаются и другие неидентифицированные продукты окисления; общая схема реакции не ясна. Следует иметь в виду, что окисление нуклеозидов с незащищенной гидроксильной группой при С-5′ приводит к частичному окислению с образованием уроновых кислот, рибозо- или дезоксирибозоряда [127, 149].

В процессе окисления под действием перманганата происходит разрушение сопряженной π-электронной системы гетероциклических оснований, что приводит к исчезновению характерного поглощения в области 250—290 *ммк*. Если о скорости окисления оснований судить по падению оптической плотности растворов производных в этом интервале длин волн, то 5′-нуклеотиды по своей реакционной способности к действию данного реагента могут быть расположены в ряд [130]:

$$pdT > pU > pC \sim pdC > pG$$

Реакционная способность нуклеозидов примерно такая же, как соответствующих нуклеотидов. При окислении сравнительно концентрированными растворами перманганата (0,03 *моль/л*) при pH 6,7 и 0° C оптическая плотность всех пиримидиновых нуклеотидов и нуклеозидов уменьшается практически до нуля за 1 *ч*, тогда как поглощение гуанозина изменяется всего на 10%. Уменьшение концентрации перманганата до $4 \cdot 10^{-4}$ *моль/л* дает возможность полностью окислить тимидин за 2 *ч*; оптическая плотность

растворов уридина за это же время падает на 50%, цитидина и дезоксицитидина — на 10%, а гуанозина и дезоксигуанозина не меняется вообще[130]. Природа продуктов окисления в данных условиях пока не выяснена. Таким образом, при использовании разбавленных растворов перманганата из компонентов ДНК тимидин реагирует с наибольшей скоростью, и поэтому реакция, вероятно, может быть использована для специфической модификации тимидина в составе ДНК.

Более специфичен, чем перманганат калия, другой агент — четырехокись осмия, окисляющая только пиримидиновые основания и не затрагивающая пуриновые[131, 132]. Выше (см. стр. 333) уже рассматривалась реакция четырехокиси осмия с пиримидиновыми нуклеозидами и нуклеотидами, приводящая к насыщению двойной связи С-5—С-6 с образованием 5,6-диокси-5,6-дигидропиримидинов. После окисления (см. стр. 333) образующиеся диолы могут быть превращены обработкой щелочью в уреидогликозиды LXXVIII[131]; остатки мочевины далее могут быть удалены кислотным гидролизом[131] или действием гидразина, как описано ранее. В случае тимидина протекающая реакция может быть представлена следующей схемой[131]:

$$\text{Тимидин} \xrightarrow{OsO_4} \text{осмиевый эфир} \longrightarrow \text{5,6-диокси-5,6-дигидротимидин} \longrightarrow [\text{LXXVIII}] \longrightarrow NH_2CONH_2 + CH_3COCH_2OH + CO_2 + R{-}OH$$

LXXVIII

R — остаток дезоксирибозы

Поскольку тимидин реагирует значительно быстрее цитидина (см. стр. 333), окисление четырехокисью осмия может быть использовано для селективного удаления остатков тимина из ДНК.

Полинуклеотиды. При окислении перманганатом калия растворов ДНК[133-137] и РНК[138] (обычно реакция проводится при pH 9 и 37° С в течение 19—20 *ч*) наблюдается количественное превращение пиримидиновых оснований и гуанина и в полиуглеводнофосфатной цепи из гетероциклических оснований остается только аденин. В остальных звеньях полимера рибозильные или дезоксирибозиль-

ные группы оказываются связанными с остатками мочевины*, а также с неидентифицированными азотсодержащими продуктами окисления, более устойчивыми, чем мочевина, к кислотному и щелочному гидролизу[137]. После удаления мочевины обработкой щелочью[135, 136] или путем замещения гидразином с последующим его удалением обработкой альдегидами[134] ДНК можно расщепить по местам локализации дезоксирибозильных остатков со свободным гликозидным центром (см. гл. 10). При щелочном методе такое расщепление цепи происходит одновременно с удалением остатков мочевины, а при обработке гидразином и альдегидом для расщепления необходима дополнительная обработка щелочью. В обоих случаях неидентифицированные азотсодержащие компоненты не удаляются и при расщеплении образуются олигонуклеотиды, содержащие аденин и неизвестное соединение[137], что не дает возможности использовать метод для изучения распределения адениновых звеньев в ДНК. При окислении РНК[138] также, по-видимому, можно ожидать появления наряду с мочевиной подобных продуктов окисления.

В разбавленных ($4 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*) растворах окисление перманганатом чувствительно ко вторичной структуре полинуклеотида. При нейтральных значениях pH и 0° С данный агент не окисляет основания в составе нативной ДНК, тогда как окисление денатурированной ДНК протекает быстро[130]. Аналогично при окислении в этих же условиях тРНК затрагиваются, по-видимому, только те основания, которые находятся в петлевых участках[130]. Более концентрированные растворы перманганата окисляют и нативную ДНК, хотя окисление начинается после заметного индукционного периода[130]. Как уже отмечалось, природа продуктов окисления в этих условиях пока не выяснена.

Реакция с четырехокисью осмия может быть использована для удаления тимина из ДНК[131]. Необходимость щелочной обработки для раскрытия цикла образующихся 5,6-диокси-5,6-дигидропиримидинов делает данную реакцию неприменимой для получения апиримидиновой РНК, поскольку в отличие от ДНК рибополимер легко гидролизуется в щелочных растворах до смеси мононуклеотидов. Действие четырехокиси осмия также специфично по отношению ко вторичной структуре полинуклеотида; в определенных условиях (см. стр. 334) реагент не окисляет нативную ДНК[132, 133] и комплекс (поли-А) · (поли-U). При действии данного агента на тРНК, по-видимому, происходит окисление нуклеозидных звеньев лишь в односпиральных участках[132].

---

* В низкомолекулярных продуктах окисления ДНК и РНК были обнаружены гуанидин и мочевина[136, 138], но не найден биурет, образующийся при окислении мономерных производных цитозина.

VI. РАСЩЕПЛЕНИЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРЕКИСНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Еще одним химическим реагентом, расщепляющим гетероциклические пиримидиновые производные нуклеиновых кислот, является перекись водорода. Пуриновые производные под действием перекиси водорода практически не расщепляются. Так, хотя при взаимодействии дезоксиаденозин-5′-фосфата с 0,05 *M* раствором перекиси водорода в присутствии ионов Fe^{3+} при pH 7,4 и 37°C после 48 *ч* реакции обнаруживаются неидентифицированные продукты расщепления пуринового цикла[124], их количество, однако, не превышает 6% от исходного нуклеотида*. Еще в меньшей степени расщепляется гуаниновое ядро[124]. Конечными продуктами расщепления урацила, его нуклеозидов и нуклеотидов 3 *M* раствором перекиси водорода при pH 9—9,5 являются мочевина, рибозилмочевина и фосфаты рибозилмочевины соответственно, а также ряд неидентифицированных продуктов[139]. В реакционной смеси образуется, кроме того, перекисное производное, структура которого не установлена[139]. По-видимому, тимин и его нуклеозиды и нуклеотиды расщепляются аналогично. Относительно продуктов расщепления производных цитозина сведений пока нет.

Механизм действия перекиси водорода неясен. При малых концентрациях перекиси водорода (10^{-3} — 10^{-2} *моль/л*) существенную роль в этих реакциях играет образование радикалов, катализируемое соединениями переходных металлов, следы которых всегда присутствуют в реакционной смеси. Действительно, в присутствии такого комплексообразователя, как этилендиаминтетрауксусная кислота, расщепление остатков урацила и цитозина в полиуридиловой и полицитидиловой кислотах прекращалось или по крайней мере резко замедлялось[140].

При щелочных значениях pH и высоких концентрациях перекиси[139] окисление, возможно, идет по пути нуклеофильного присоединения анионов HOO^- по двойной связи С-5—С-6 пиримидиновых производных[139]. Относительная скорость модификации различных нуклеотидов (о которой можно судить по падению оптической плотности в интервале 250—300 *ммк* при нейтральных значениях pH и малых концентрациях перекиси) падает в ряду[124, 141]

производные цитозина > производные тимина > производные аденина > производные гуанина

При повышении pH скорость модификации производных урацила и тимина в растворах при высокой концентрации (~3 *M*) перекиси водорода повышается, тогда как модификация производ-

* О действии перекиси водорода на нуклеиновые кислоты и их мономерные компоненты с образованием N-окисей см. стр. 388.

ных цитозина, аденина и гуанина мало зависит[139] от pH. При pH 8—9,5 производные урацила и тимина реагируют с максимальной скоростью.

Побочным эффектом действия перекиси водорода на нуклеозиды и нуклеотиды является отщепление оснований от углеводного остатка (подробнее см. стр. 507).

При облучении растворов производных нуклеиновых оснований рентгеновскими лучами в присутствии кислорода наблюдаются процессы, во многом аналогичные тем, которые происходят под действием перекиси водорода. Это связано с возникновением при облучении тех же радикалов, что и при радикальном разложении перекиси водорода[142—144, 155—157].

Показано (обзоры — см.[155—158]), что при облучении рентгеновскими и γ-лучами в присутствии кислорода производные тимина, урацила и цитозина образуют гидроперекиси за счет присоединения по двойной связи С-5—С-6. Эти гидроперекиси могут затем превращаться в гликоли и — в случае производных цитозина и урацила — в производные изобарбитуровой кислоты. Возможно, что подобный ряд превращений наблюдается и при действии перекиси водорода в присутствии ионов переходных металлов[124]. Образующиеся продукты присоединения могут далее разрушаться. Деструкция оснований под действием излучения довольно мала[144, 155, 158]. При малых концентрациях перекиси водорода в присутствии ионов Fe^{3+} она также, по-видимому, незначительна[124]. При действии на нуклеиновые кислоты перекиси водорода[122, 123, 140, 145, 146] или ионизирующей радиации[144, 146, 155—158] наряду с модификацией оснований происходит интенсивная деструкция полинуклеотидной цепи. Однако, если реакцию с перекисью водорода проводить при низкой температуре, деструкцию удается в значительной степени предотвратить[139]. Пользуясь значительным различием скоростей модификации оснований при высоких значениях pH, можно добиться селективной модификации остатков урацила в составе РНК или тимина в составе ДНК. Так, при действии на суммарную тРНК из дрожжей 6 *М* раствора перекиси водорода при pH 10 и +1 °С после 20 *ч* наблюдается полное расщепление остатков урацила в цепи, тогда как остатки цитозина и гуанина модифицируются только на 10—14%[139]. Отсутствие информации о природе продуктов расщепления, образующихся под действием перекиси водорода, не позволяет пока судить о возможностях применения этого реагента для целей модификации.

Перекись водорода также является реагентом, чувствительным по отношению ко вторичной структуре. Так, модификация урацила в составе полиуридиловой кислоты резко замедляется в присутствии полиадениловой кислоты, тогда как на модификацию полицитидиловой кислоты полиадениловая кислота не влияет[140].

Расщепление цикла оснований нуклеиновых кислот наблюдается и при действии органических перкислот[141, 147, 148, 159, 160]. При обработке этими реагентами производных аденина и цитозина были получены соответствующие N-окиси (см. стр. 388); с производными урацила, тимина и гуанина протекает расщепление цикла. На примере реакции с *м*-хлорпероксибензойной кислотой было показано, что уридин, тимидин и гуанозин дают при окислении уреидогликозиды и ряд других продуктов, аналогичных тем, которые получаются при окислении этих соединений перманганатом[148, 159]. Зависимость скорости реакции от pH имеет четкий максимум; максимальная скорость превращения наблюдается в щелочной области при значениях pH несколько больших, чем pK_a перкислоты (табл. 7.12). Это позволяет предположить нуклеофильный характер реакции, включающий взаимодействие аниона перкислоты с нейтральной молекулой основания. В случае пиримидиновых производных сначала, по-видимому, происходит присоединение аниона перкислоты по двойной связи с образованием перекисного соединения, которое превращается в 5,6-окись, гидролизующуюся далее до 5,6-диокси-5,6-дигидропроизводного. Последнее соединение претерпевает далее превращения, аналогичные наблюдаемым под действием перманганата (см. стр. 473). Наличие максимума при разрушении гуанинового цикла менее ясно.

Таблица 7.12. **Кинетика деградации уридина, тимидина и гуанозина при 40°C под действием *м*-хлорпероксибензойной кислоты (pK_a перкислоты 7,6)[148]**

Нуклеозид	Оптимальное значение pH	*k*, *моль*$^{-1}$·*мин*$^{-1}$
Гуанозин	8,4	4,4
Уридин	8,6	3,8
Тимидин	8,6	0,7

Таким образом, в данной главе рассмотрены реакции расщепления и перегруппировок гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, часть которых широко применяется при структурных исследованиях полимеров. Однако для исследования структуры нуклеиновых кислот после селективного удаления одного основания или группы оснований необходимо провести специфическое расщепление фосфодиэфирных связей, так чтобы затрагивались только те из них, которые соединяют с остальной частью молекулы образующиеся после удаления оснований углеводные остатки со свободным гликозидным центром. Эта проблема неразрывно связана с химией фосфоэфиров и фосфодиэфиров углеводов, рассматриваемых далее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brookes P., Lawley P. D., Biochem. J., 89, 127 (1963).
2. Mian A. M., Walker R. T., J. Chem. Soc. (C), 1968, 2577.
3. Jones A. S., Mian A M., Walker R. T., J. Chem. Soc. (C), **1966**, 692.
4. Magrath D. I., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 79, 3252 (1957).
5. Gordon M. P., Weliky V. S., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 79, 3245 (1957).
6. Price C. C., Gache G. M., Koneru P., Shibakawa R., Sowa J. R., Yamaguchi M., Biochim. Biophys. Acta, 166, 327 (1968).
7. Kriek E., Emelot P., Biochemistry, 2, 733 (1963).
8. Brookes P., Dipple A., Lawley P. D., J. Chem. Soc. (C), 1968, 2026.
9. Haines J. A., Reese C. B., Todd A., J. Chem. Soc., **1962**, 5281.
10. Brown G. B., Gordon M. P., Magrath D. F., Hampton A., in «Ciba Foundation Symposium Chemistry and Biology of Purines», J. and A. Churchill, Ltd., L., 1957, p. 57.
11. Kriek E., Emelot P., Biochim. Biophys. Acta, 91, 59 (1964).
12. Lawley P. D., Brookes P., J. Mol. Biol., 25, 143 (1967).
13. Lawley P. D., in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», v. 5, Davidson J. N., Cohn W. E. (eds), N. Y. — L., Acad. Press, 1966, p. 91.
14. Hurst R. O., Kurkiss A., Canad. J. Biochem. Physiol., 36, 919, 931 (1958).
15. Lawley P. D., Wallik C. A., Chem. a. Ind., **1957**, 633.
16. Lawley P. D., Proc. Chem. Soc., **1957**, 290.
17. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1961**, 3923.
18. Brookes P., Lawley P. D., Biochem. J., 80, 496 (1961).
19. Jones J. W., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 85, 193 (1963).
20. Townsend L. B., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 85, 243 (1963); in «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», v. 1, Zorbach W. W., Tipson R. S. (eds), J. Wiley, N. Y. — L., 1968, p. 315.
21. Townsend L. B., Chem. Revs., 67, 533 (1967).
22. Show E., J. Am. Chem. Soc., 80, 3890 (1958).
23. Shaw E., J. Am. Chem. Soc., 81, 6021 (1959).
24. Shaw E., J. Am. Chem. Soc., 83, 4770 (1961).
25. Baugh C. M., Shaw E., Biochim. Biophys. Acta, 114, 213 (1966).
26. Cavalieri J. F., Tinker J. F., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc.. 70, 3875 (1948).
27. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1960**, 539.
28. Carter C. E., J. Biol. Chem., 223, 139 (1956).
29. Pal B. C., Horton C. A., J. Chem. Soc., **1964**, 401.
30. Stevens M. A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 80, 2759 (1958).
31. Stevens M. A., Giner-Sorolla A., Smith H. W., Brown G. B., J. Org. Chem., 27, 567 (1962).
32. Stevens M. A., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 81, 1734 (1959).
33. Stevens M. A., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 82, 1148 (1960).
34. Klenow H., Frederiksen S., Biochim. Biophys. Acta, 52, 384 (1961).
35. Montgomery J. A., Newson K., Clayton S. J., Thomas H. J, J. Org. Chem., 31, 2202 (1966).
36. Ikehara M., Muneyama K., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 14, 46 (1966).
37. Elion G. B., J. Org. Chem., 27, 2478 (1962).
38. Montgomery J. A., Thomas H. J., J. Org. Chem., 28, 2304 (1963).
39. Baker B. R., Joseph J. P., Am. Chem. Soc., 77, 15 (1955).

40. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966, стр. 31.
41. King M. E., Carter C. E., Biochim. Biophys. Acta, 44, 232 (1960).
42. Dimroth O., Ann., 373, 336 (1910).
43. Taylor E. C., Loeffler P. K., J. Am. Chem. Soc., 82, 3147 (1960).
44. Leonard N. J., Fujii T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51, 73 (1964).
45. Leonard N. J., Achmatowicz S., Loeppky R. N., Carraway K. L., Grimm W. A. H., Szweykowska A., Hamzi H. Q., Skoog F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 709 (1966).
46. Martin D. M. G., Reese C. B., J. Chem. Soc. (C), 1968, 1731.
47. Grimm W. A. H., Leonard N. J., Biochemistry, 6, 3625 (1967).
48. Taylor E. C., in «Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Purines», J. and A. Churchill, Ltd., L., 1957, p. 57.
49. Brown D. J., Nature, 189, 828 (1961).
50. Macon J. B., Wolfenden R., Biochemistry, 7, 3453 (1968).
51. Chheda G. B., Hall R. H., Biochemistry, 5, 2082 (1966).
52. Leonard N. J., Carraway K. L., Helgeson J. P., J. Heterocyclic Chem., 2, 291 (1965).
53. Coddington A., Biochim. Biophys. Acta, 59, 472 (1962).
54. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966, стр. 286.
55. Jones A. S., Mian A. M., Walker R. T., J. Chem. Soc. (C), 1968, 1784.
56. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 309 (1960).
57 (58). Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 491 (1960).
59. Fox J. J., Shugar D., Bull. Soc. chim. Belge, 61, 44 (1952).
60. Shugar D., Fox J. J., Biochim. Biophys. Acta, 9, 199 (1952).
61. Shugar D., Fox J. J., Bull. Soc. chim. Belge, 61, 293 (1952).
62. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., 1962, 1349.
63. Siedel H., Biochim. Biophys. Acta, 138, 98 (1967).
64. Cohn W. E., Doherty D. G., J. Am. Chem. Soc., 78, 2863 (1956).
65. Green M., Cohen S. S., J. Biol. Chem., 225, 397 (1957).
66. Green M., Cohen S. S., J. Biol. Chem., 228, 601 (1957).
67. Batt R. D., Martin J. K., Ploeser J. M., Murray J. J., J. Am. Chem. Soc., 76, 3663 (1954).
68. Cerutti P., Kondo Y., Landis W. R., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., 90, 771 (1968).
69. Levene P. A., La Forge F. B., Chem. Ber., 45, 615 (1912).
70. Cohn W. E., Biochem. J., 64, 28P (1956).
71. Jones A. S., Tittensor J. R., Walker R. T., J. Chem. Soc. (C), 1966, 1635.
72. Fox J. J., Miller N. C., Cushley R. J., Tetrahedron Letters, 1966, 4927.
73. Otter B. A., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., 89, 3663 (1967).
74. Doerr I. L., Fox J. J., J. Org. Chem., 32, 1462 (1967).
75. Otter B. A., Falco E. A., Fox J. J., Tetrahedron Letters, 1968, 2964.
76. Otter B. A., Falco E. A., Fox J. J., J. Org. Chem., 33, 3593 (1968).
77. Brown D. J., Harper J. S., J. Chem. Soc., 1965, 5543.
78. Brown D. J., Paddon-Row M. N., J. Chem. Soc. (C), 1967, 1928.
79. Brown D. J., England B. T., J. Chem. Soc. (C), 1967, 1922.
80. Wempen I., Brown G. B., Ueda T., Fox J. J., Biochemistry, 4, 54 (1965).
81. Ueda T., Fox J. J., J. Org. Chem., 29, 1770 (1964).
82. Mizuno H., Okuyama H., Hayatsu H., Ukita T., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 12, 1240 (1964).
83. Levene P. A., Bass L. W., J. Biol. Chem., 71, 126 (1926).
84. Baron F., Brown D. M., J. Chem. Soc., 1955, 2855.
85. Davis F. F., Allen F. W., J. Biol. Chem., 227, 907 (1957).

86. Temperli A., Türler H., Rüst P., Danon A., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 91, 462 (1964).
87. Будовский Э. И., Хайнс Д. А., Кочетков Н. К., ДАН СССР, 158, 379 (1964).
88. Lingens F., Schneider-Bernlöhr H., Biochim. Biophys. Acta, 123, 611 (1966).
89. Werwoerd D. W., Zillig W., Biochim. Biophys. Acta, 68, 484 (1963).
90. Habermann V., Coll. Czech. Chem. Comm., 26, 3147 (1961).
91. Lingens F., Schneider-Bernlöhr H., Angew. Chem., 76, 378 (1964).
92. Lingens F., Schneider-Bernlöhr H., Ann., 686, 134 (1967).
93. Ellery B. W., Simmons R. H., Nature, 210, 1159 (1966).
94. Sinsheimer R. L., Sedat J., J. Mol. Biol., 9, 489 (1964).
95. Cape R., Spencer J., Canad J. Biochem., 46, 1063 (1968).
96. Cashmore A. R., Petersen G. B., Biochim. Biophys. Acta, 174, 591 (1969).
97. Takemura S., Biochim. Biophys. Acta, 29, 447 (1958).
98. Takemura S., Bull. Chem. Soc. Japan, 32, 926 (1959).
99. Takemura S., Bull. Chem. Soc., Japan, 32, 920 (1959).
100. Chargaff E., Rüst P., Temperli A., Morisawa S., Danon A., Biochim. Biophys. Acta, 76, 149 (1963).
101. Habermann V., Biochim. Biophys. Acta, 55, 999 (1962).
102. Habermann V., Maidlova E., Coll. Czech. Chem. Comm., 28, 2537 (1963).
103. Habermann V., Coll. Czech. Chem. Comm., 28, 510 (1963).
104. Chargaff E., Buchowicz J., Türler H., Shapiro H. S., Nature, 206, 145 (1965).
105. Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А., Усов А. И., Чижов А. С., Шибаев В. Н., в кн. «Химия углеводов», Изд. «Химия», 1967, стр. 113.
106. Hayes D. H., Hayes-Baron F., J. Chem. Soc. (C), 1967, 1528.
107. Verwoerd D. W., Zillig W., Kohlhage H., Z. physiol. Chem., 332, 184 (1963).
108. Verwoerd D. W., Kohlhage H., Zillig W., Nature, 192, 1038 (1961).
109. Schuster H., J. Mol. Biol., 3, 447 (1961).
110. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Симукова Н. А., Биохимия, 27, 519 (1962); Biochim. Biophys. Acta, 55, 255 (1962).
111. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Demushkin V. P., Turchinsky M. F., Simukova N. A., Sverdlov E. D., Biochim. Biophys. Acta, 142, 35 (1967).
112. Кочетков Н. К., Будовский Э И., Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., ДАН СССР, 172, 603 (1967).
113. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Биохимия, 28, 741 (1963).
114. Nemethy G., Scheraga H. A., J. Phys. Chem., 66, 1773 (1962).
115. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Турчинский М. Ф., Демушкин В. П., ДАН СССР, 152, 1005 (1963).
116. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Turchinsky M. F., Simukova N. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 19, 49 (1965).
117. Турчинский М. Ф., Гуськова Л. И., Будовский Э. И., Мол. биол., 1, 792 (1967).
118. Budowsky E. I., Simukova N. A., Guskova L. I., Biochim Biophys. Acta, 166, 755 (1968).
119. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Демушкин В. П., ДАН СССР, 168, 102 (1966).
120. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Демушкин В. П., Мол. биол., 1, 583 (1967).

121. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochemistry, 5, 3012 (1966).
122. Freese E., Bautz-Freese E., Graham S., Biochim. Biophys. Acta, 123, 17 (1966).
123. Rhaese H. J., Freese E., Biochim. Biophys. Acta, 155, 476 (1968).
124. Rhaese H. J., Freese E., Melzer M. S., Biochim. Biophys. Acta, 155, 491 (1968).
125. Freese E., Bautz-Freese E., Biochemistry, 4, 2419 (1965).
126. Benn M. H., Chatamra B., Jones A. S., J. Chem. Soc., 1960, 1014.
127. Howgate P., Jones A. S., Tittensor J. R., J. Chem. Soc., (C), 1968, 275.
128. Jones A. S., Walker R. T., J. Chem. Soc., 1963, 3554.
129. Chatamra B., Jones A. S., J. Chem. Soc., 1963, 811.
130. Hayatsu H., Ukita T., Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, 556 (1967).
131. Burton K., Riley W. T., Biochem. J., 98, 70 (1966).
132. Burton K., Varney N. F., Zamecnik P. C., Biochem. J., 99, 29c (1966).
133. Jones A. S., Bayley C. R., Trans. Farad. Soc., 55, 492 (1959).
134. Jones A. S., Walker R. T., Nature, 202, 1108 (1964).
135. Jones A. S., Walker R. T., Nature, 202, 24 (1964).
136. Jones A. S., Ross G. W., Takemura S., Thompson T. W., Walker R. T., J. Chem. Soc., 1964, 373.
137. Darby G. K., Jones A. S., Tittensor J. K., Walker R. T., Nature, 216, 793 (1967).
138. Holbrook J. J., Jones A. S., Welch M. J., J. Chem. Soc., 1965, 3998.
139. Priess H., Zillig W., Z. physiol. Chem., 342, 73 (1965).
140. Melzer M. S., Tomlinson R. V., Arch. Biochem. Biophys., 115, 226 (1966).
141. Schweitz H., Luzzati D., J. chim. phys., 60, 1173 (1963).
142. Scholes G., Weiss J., Nature, 185, 305 (1960).
143. Ekert B., Monier K., Nature, 184, 58 (1959).
144. Scholes G., Ward J. F., Weiss J., J. Mol. Biol., 2, 379 (1960).
145. Schweitz H., C. r. D264, 1335 (1967).
146. Pollard E. C., Weller P. K., Rad. Res., 32, 417 (1967).
147. Luzzati D., Schweitz H., Bach M. L., Chevallier M. R., J. chim. phys., 58, 1021 (1961).
148. Subbraman L. R., Subbraman J., Behrman E. J., Chem. Comm., 1968, 1024.
149. Harmon R. E., Zmarova C. V., Gupta S. K., Chem. a. Ind., 1969, 1141.
150. Shheda G. B., Hall R. H., Tauna P. M., J. Org. Chem., 34, 3498 (1969).
151. Sander E. G., J. Am. Chem. Soc., 91, 3629 (1969).
152. Otter B. A., Falco E. A., Fox J. J., J. Org. Chem., 34, 2636 (1969).
153. Будовский Э. И., Домкин В. Д., Кочетков Н. К., ДАН СССР (1970) (в печати).
154. Rhaese H. J., Biochim. Biochys. Acta, 166, 311 (1968).
155. Weiss J. J., Progr. Nucl. Acid Res., 3, 103 (1964).
156. Schules G., Progr. Biophys., 13, 59 (1963).
157. Freese E., Bautz-Freese E., Radiation Res., Suppl. 6, 97 (1966).
158. Latarjet R., Ekert B., Demeresman P., Radiation Res., Suppl. 3, 247 (1963).
159. Subbaraman L. R., Subbaraman J., Behrman E. J., Biochemistry, 8, 3059 (1969).
160. Ebel J. P., Gangloff J., Bull. Soc. chim. Biol., 50, 2335 (1968).

ГЛАВА 8

РАСЩЕПЛЕНИЕ N-ГЛИКОЗИДНЫХ СВЯЗЕЙ В НУКЛЕОЗИДАХ, НУКЛЕОТИДАХ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

I. ВВЕДЕНИЕ

Реакции гидролиза гликозидных связей в нуклеозидах, нуклеотидах и нуклеиновых кислотах сыграли в свое время важную роль в установлении строения этих соединений. В настоящее время они находят широкое применение при анализе нуклеотидного состава нуклеиновых кислот и изучении их первичной структуры.

Известные методы расщепления N-гликозидных связей в нуклеозидах, нуклеотидах и нуклеиновых кислотах можно условно подразделить на две группы: 1) прямые методы расщепления N-гликозидных связей в обычных нуклеозидных звеньях под действием кислот или, реже, оснований; 2) косвенные методы, в которых лабилизация N-гликозидных связей достигается предварительной модификацией гетероциклического основания или сахарного остатка. Реакции гидролиза гликозидных связей после модификации оснований, не приводящей к нарушению их ароматического характера, мы относим к прямым методам.

II. ГИДРОЛИЗ N-ГЛИКОЗИДНЫХ СВЯЗЕЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ КИСЛОТАМИ

Отщепление гетероциклических оснований при нагревании нуклеиновых кислот с минеральными кислотами было описано уже в первых исследованиях, посвященных этому классу соединений[1, 2]. Общую схему реакции можно представить в следующем виде:

R''OCH₂ … N (R'O, R) —H₂O (H⁺)→ R''OCH₂ … OH (R'O, R) + N–H

R=H или OH; R' и R''—атомы водорода или незамещенные и замещенные фосфатные группировки

Для отщепления оснований используют водные растворы различных сильных неорганических кислот (HCl, HBr, H_2SO_4, $HClO_4$), ряда органических кислот (CCl_3COOH, $HCOOH$, CH_3COOH), а также сульфокатиониты в H^+-форме[3]. Ввиду разнообразия условий (рН, температура, продолжительность реакции), применяемых для кислотного гидролиза N-гликозидных связей в различных нуклеозидах (например, табл. 8.1), а также моно-, олиго- и полинуклеотидах, обычно трудно провести количественное сравнение данных различных авторов. В то же время исследования кинетики кислотного гидролиза N-гликозидных связей немногочисленны и касаются почти исключительно нуклеозидов (табл. 8.2 и 8.3). Все же из совокупности имеющихся к настоящему времени данных можно сделать некоторые достаточно определенные выводы о связи строения соединений с их лабильностью к кислотному гидролизу. 2′-Дезоксирибозильные производные гидролизуются в 100—1000 раз быстрее соответствующих рибозильных производных;

Таблица 8.1. **Условия кислотного гидролиза ряда нуклеозидов**

Нуклеозид	Условия, необходимые для отщепления гетероциклического основания на 100%	Литература
Дезоксиаденозин	0,002 н. HCl; 100°C; 1 *ч*	*4*
Аденозин	0,1 н. HCl; 100°C; 1 *ч*	*5*
Дезоксиуридин	0,2 н. HCl; 100°C; 2 *ч*	*6*
Уридин	3 н. HCl; 125°C; 4 *ч*	*7*

Таблица 8.2. **Кинетические параметры кислотного гидролиза нуклеозидов**

$k_0 = k_1/[H^+]$, где k_1 — константа скорости гидролиза (первого порядка) при данном значении рН; ΔH_a — энтальпия активации; $\lg P$ — величина, пропорциональная энтропии активации и равная $\lg k_0 + \Delta H_a/2,3RT$

Исходное соединение	k_0, *сек*$^{-1}$ при 80°C	ΔH_a, *ккал моль*	$\lg P$
5-Окси-2′-дезоксиуридин	$1,4 \cdot 10^{-4}$	19,2	8,1
5-Бром-2′-дезоксиуридин	$4,4 \cdot 10^{-5}$	31,0	14,8
5-Хлор-2′-дезоксиуридин	$4,0 \cdot 10^{-5}$	31,0	14,8
5-Фтор-2′-дезоксиуридин	$4,2 \cdot 10^{-5}$	31,0	14,8
1-(2′-Дезокси-β-*D*-ликсофуранозил)-урацил	$4,0 \cdot 10^{-5}$	31,0	14,8
5-Метил-2′-дезоксиуридин (тимидин)	$2,2 \cdot 10^{-5}$	25,1	10.0
2′-Дезоксиуридин	$1,3 \cdot 10^{-5}$	31,0	14,2
2′,3′-Дидезокси-3′-иодуридин	$5,8 \cdot 10^{-6}$	31,0	10.4
5-Оксиуридин	$5,1 \cdot 10^{-7}$*	20,0	6,1

* Для данного соединения k_1 не зависит от рН.

внутри каждого из этих классов производные пуринов гидролизуются намного быстрее, чем производные пиримидинов (см. табл. 8.3).

Таблица 8.3. **Кинетические параметры кислотного гидролиза нуклеозидов и их монофосфатов при pH 1**[9, 9a]

для производных аденина, гуанина и тимина $\lg k_1$ линейно зависит от pH; для производных цитозина в интервале pH 1—4 величина $\lg k_1$ от pH не зависит (см. рис. 8.1)

Исходное соединение	k_1, $сек^{-1}$ при 37°C	ΔH_a, *ккал/моль*
2′-Дезоксиаденозин	$4,3 \cdot 10^{-4}$	6,9
2′-Дезоксигуанозин	$8,3 \cdot 10^{-4}$	8,1
2′-Дезоксицитидин	$1,1 \cdot 10^{-7}$	—
2′-Дезоксиуридин	10^{-7}*	—
Аденозин	$3,6 \cdot 10^{-7}$	6,0
Гуанозин	$9,36 \cdot 10^{-7}$	11,5
Цитидин	10^{-9}	—
Уридин	10^{-9}	—
2′-Дезоксиаденозин-5′-фосфат	$3,1 \cdot 10^{-4}$	—
Аденозин-5′-фосфат	$3,8 \cdot 10^{-7}$	—
Аденозин-2′(3′)-фосфат	$3,3 \cdot 10^{-7}$	—
2′-Дезоксигуанозин-5′-фосфат	$1,8 \cdot 10^{-4}$	—
Гуанозин-2′(3′)-фосфат	$6,6 \cdot 10^{-7}$	—
2′-Дезоксицитидин-5′-фосфат	$2,0 \cdot 10^{-8}$	—
Тимидин-5′-фосфат	$2,0 \cdot 10^{-8}$	—

* Получено экстраполяцией из данных табл. 8.2.

Механизм реакции. Исследованию механизма кислотного гидролиза N-гликозидов, и в частности нуклеозидов, посвящен ряд работ[10–16]. Тем не менее существующие к настоящему времени представления на этот счет остаются в значительной мере гипотетическими. Предложенные различными авторами варианты механизма кислотного гидролиза N-гликозидов представлены на схеме (см. стр. 488).

Для большинства исследованных нуклеозидов показано, что скорость их кислотного гидролиза линейно зависит от концентрации водородных ионов (рис. 8.1). Следовательно, ионы водорода должны принимать участие в стадии, определяющей общую скорость гидролиза. Согласно механизму, изображенному на схеме, атаке протоном может подвергаться либо гликозидный атом азота (путь I → IIa → IV), либо циклический атом кислорода углеводного остатка (путь I → IIв → IIIa). Первый механизм был отвергнут на основании того, что в случае N-гликозидов ароматических аминов протонирование гликозидного азота подавляет гидролиз[11]. Однако недавно для объяснения ряда особенностей гидролиза пиримидиновых дезоксирибонуклеозидов[11a] был предложен сходный

IIa → IV

IIa ⇌ I ($-H^+$) ; I ⇌ IIб (H^+) ; I ⇌ IIв (H^+)

IIв → [IIIa ⇌ IIIб] → V → продукты

R= H или OH

механизм, включающий протонирование пиримидинового ядра (см. стр. 491).

В настоящее время общепринятым является механизм, предполагающий в качестве первой стадии протонирование циклического кислорода углеводного остатка (I→IIв) с последующим раскрытием фуранозного цикла рибозы (или дезоксирибозы) * и образованием промежуточного продукта типа четвертичного шиффова основания (IIIа). В соответствии с этим механизмом скорость реакции кислотного гидролиза нуклеозидов должна определяться двумя основными факторами: легкостью присоединения протона по циклическому кислороду (равновесной концентрацией протонированного по кислороду промежуточного продукта IIв) и легкостью раскрытия фуранозного цикла. Последняя должна зависеть от устойчивости промежуточных продуктов IIIа и IIIб, т. е. от способности гетероциклических оснований стабилизовать эти структуры за счет подачи электронов. С точки зрения такого механизма различия в скоростях гидролиза между дезоксирибонуклеозидами и рибонуклеозидами вызваны отрицательным индуктивным эффектом гидроксильной группы при C-2′ в рибопроизводных. Этот индуктивный эффект затрудняет протонирование циклического кислорода и дестабилизует промежуточные продукты типа IIIа и IIIб **. Аргументами в пользу такого объяснения может служить то, что замещение атомов водорода гидроксильных групп в углеводных остатках нуклеозидов на более электроотрицательные группировки, например на тозильную[18], 2,4-динитробензоильную[19], или замещение

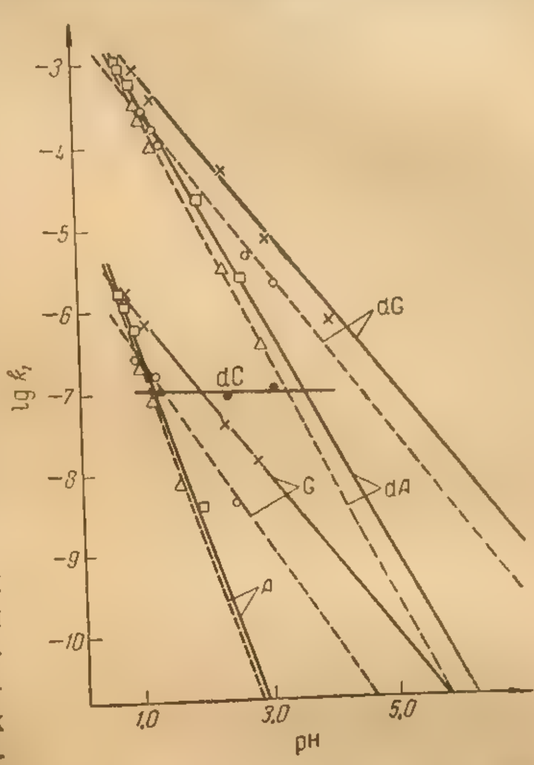


Рис. 8.1. Зависимость константы скорости (первого порядка) гидролиза нуклеозидов от pH при 37 (сплошные кривые) и 23° C (пунктирные кривые)[9]

* В случае кислотного гидролиза 1-N-(β-*D*-рибофуранозил)-индола действительно было показано образование промежуточного продукта с раскрытием рибофуранозного цикла[17].

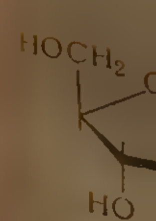
** С точки зрения механизма, предполагающего мономолекулярное отщепление протонированного основания (путь I → → IV), электроноакцепторные заместители в углеводном остатке должны затруднять обе стадии — как протонирование ядра, так и разрыв N-гликозидной связи.

гидроксильной группы на атом иода[8] (см. табл. 8.2) вызывает заметное уменьшение скорости гидролиза, в то время как 2′,3′-дидезоксинуклеозиды гидролизуются еще быстрее, чем соответствующие 2′-дезоксинуклеозиды[20]. (табл. 8.4).

Таблица 8.4. **Кинетические параметры кислотного гидролиза (1 н. HCl, 100 °C) рибо- и дезоксирибонуклеозидов[8]**

Исходное соединение	Время полупревращения, *мин*	k_1, *сек*$^{-1}$
Уридин	За 5 *ч* гидролиз на 5%	—
2′-Дезоксиуридин	104	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$
Тимидин	56	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$
2′,3′-Дидезоксиуридин	8,2	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$
3′-Дезокситимидин	7,2	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$

Бóльшую легкость гидролиза пуриновых нуклеозидов по сравнению с пиримидиновыми принято объяснять переносом протона от протонированного по N-3 остатка пурина на циклический кислород сахара[10, 12]. Перенос осуществляется, по-видимому, в *син*-конформации нуклеозида, когда атом N-3 остатка пурина и циклический кислород рибозы сближены (см. стр. 142). При этом предполагается, что протонированные пуриновые нуклеозиды могут существовать в таутомерной форме, в которой протон находится при атоме N-3 (хотя достоверных данных о существовании таких таутомерных форм в настоящее время не имеется) или же по N-3 присоединяется второй протон, т. е. образуется дважды протонированный по пуриновому ядру промежуточный продукт. Этот процесс на схеме (см. стр. 488) изображен равновесием I ⇄ IIб ⇄ IIв, где X соответствует N-3 в пуриновых производных. Такое объяснение представляется, однако, маловероятным, так как в соответствии с предполагаемым механизмом скорость гидролиза N-гликозидов определяется не столько скоростью протонирования по циклическому кислороду сахара, сколько стабильностью образующегося при этом промежуточного продукта (протонированного по циклическому кислороду, IIв на схеме). Бóльшая легкость гидролиза пуриновых нуклеозидов обусловлена скорее большей способностью пуринов по сравнению с пиримидинами стабилизовать положительный заряд в промежуточных продуктах типа IIIа или IIIб. Другим возможным объяснением различий в скоростях гидролиза пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов является предположение, что гидролиз пиримидиновых производных протекает по иному механизму, заключающемуся в протонировании пиримидинового ядра с последующим мономолекулярным расщеплением N-гликозидной связи (см. стр. 491).



1. Влияние структурных факторов на кинетику гидролиза пиримидиновых производных

Заместители в ядре. В ряду дезоксирибозилурацилов * введение в положение 5 пиримидинового ядра как электронодонорных (-OH, $-CH_3$), так и электроноакцепторных заместителей (-Br, -Cl, -F) заметно повышает скорость расщепления гликозидной связи (гидролиз 5%-ной трихлоруксусной кислотой за 30 *мин* при 100° C [21]):

Исходное соединение	Степень расщепления гликозидных связей, %
2′-Дезоксицитидин	76
2′-Дезоксиуридин	3
Тимидин	4,3
5-Фтор-2′-дезоксиуридин	13
5-Хлор-2′-дезоксиуридин	17
5-Бром-2′-дезоксиуридин	16
2′-Дезоксиаденозин	96
2′-Дезоксигуанозин	100

Об этом же свидетельствуют и данные табл. 8.2 [8].

Влияние электронодонорных заместителей может быть приписано стабилизации ими промежуточных продуктов типа IIIа и IIIб. Однако влияние электроноакцепторных заместителей не может быть удовлетворительно объяснено в рамках механизма кислотного гидролиза, предполагающего промежуточное протонирование циклического кислорода остатка сахара [11a] (схема на стр. 488, путь I → IIв). Ввиду этого был предложен альтернативный механизм кислотного гидролиза урацильных дезоксирибонуклеозидов — протонирование пиримидинового ядра (вероятно, по атому 4-*экзо*-O) с последующим мономолекулярным расщеплением N-гликозидной связи:

---

* Рибозилпиримидины в большинстве случаев гидролизуются настолько медленно, что прямые кинетические измерения для них провести не удается [8, 9] (см. также табл. 8.3). 5-Оксиуридин гидролизуется, однако, с заметной скоростью [8] (см. табл. 8.2).

В соответствии с указанным механизмом IIa электронодонорные заместители при С-5 облегчают стадию протонирования пиримидинового ядра, а электроноакцепторные — разрыв гликозидной связи.

Такое предположение соответствует наблюдаемым различиям в характере влияния электронодонорных и электроноакцепторных заместителей на кинетические параметры реакции кислотного гидролиза пиримидиновых дезоксинуклеозидов. В то время как введение электронодонорных групп по С-5 понижает как энтропию, так и энтальпию активации, электроноакцепторные группы при С-5 влияют только на энтропию активации реакции гидролиза[8] (см. табл. 8.2).

Аналогичный механизм пригоден, по-видимому, и для объяснения особенностей кислотного гидролиза дезоксицитидина VI. Это соединение гидролизуется значительно легче производных дезоксиуридина. Кроме того, при тех значениях pH (<4), когда цитозиновое ядро протонировано, скорость гидролиза не зависит[9] от pH (см. рис. 8.1) *. Поэтому возможный механизм гидролиза дезоксицитидина может быть изображен следующей схемой:

VI

Введение метильной группы по С-5 цитозинового ядра не оказывает значительного влияния на скорость расщепления гликозидной связи (гидролиз 0,4 н. серной кислотой при 100° С)[23, 24]:

Исходное соединение	$k_1 \cdot 10^4$, $сек^{-1}$
2′-Дезоксицитидин	3,7
2′-Дезоксицитидин-5′-фосфат	0,6
2′-Дезоксицитидин-3′, 5′-дифосфат	0,28
5-Метил-2′-дезоксицитидин	2,9
5-Метил-2′-дезоксицитидин-5′-фосфат	0,58
5-Метил-2′-дезоксицитидин-3′, 5′-дифосфат	0,27
Тимидин	0,34
Тимидин-5′-фосфат	0,23
Тимидин-3′, 5′-дифосфат	0,12

* Имеются, однако, данные[22], что гликозидная связь в дезоксицитидине легко расщепляется уже при pH 6,8 (полное расщепление при 100° С достигается за 4 *ч*).

Ацилирование экзоциклической аминогруппы в дезоксицитидине приводит к заметной лабилизации N-гликозидной связи [25, 26]. Так, при гидролизе 4-*экзо*-N,3′-диацетил-5′-тритилдезоксицитидина 80%-ной уксусной кислотой (100° С, 5 *мин*) в продуктах реакции были обнаружены заметные количества цитозина и 4-*экзо*-N-ацетилцитозина [25]. Среди пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов наиболее лабильна к действию кислот N-гликозидная связь в производных изоцитидина VII [12, 27, 28].

VII

Сам изоцитидин является одним из немногих пиримидинрибонуклеозидов, который с заметной скоростью гидролизуется разбавленной уксусной кислотой [27]. Обычное объяснение повышенной лабильности изоцитидиновых производных к действию кислот заключается в том [12], что экзоциклической аминогруппе в пиримидиновом ядре приписывают способность переносить протон на циклический атом кислорода в углеводном остатке (возможные аргументы против этой точки зрения — см. стр. 490).

Однако в рамках механизма кислотного гидролиза, предполагающего протонирование циклического кислорода остатка рибозы, лабильность изоцитидина к кислотам можно скорее приписать стабилизующему влиянию аминогруппы на промежуточные продукты типа IIIа и IIIб. С точки зрения альтернативного механизма протонирование ядра изоцитидина должно облегчать разрыв N-гликозидной связи в большей степени, чем в 2-кетопиримидинах, так как в этом случае положительный заряд распределен между N-3 и 2-*экзо*-N:

R — остаток рибозы или рибозофосфата

Насыщение двойной связи С-5—С-6. Нарушение ароматичности пиримидинового ядра в нуклеозидах и их фосфатных производных значительно облегчает кислотный гидролиз N-гликозидной связи как для рибо-, так и для дезоксирибопроизводных[29–34]. Стабильность этих соединений в кислой среде аналогична стабильности обычных гликозидаминов. Это обстоятельство было использовано для выделения 2′-*D*-дезоксирибозы из продуктов мягкого кислотного гидролиза 5,6-дигидропроизводных дезоксицитидина и тимидина[32–34] (например, после нагревания в течение 15 *мин* при 100° С с 0,1 н. соляной кислотой). При обработке пиримидиннуклеозидов бромной водой образуются 5-бром-6-окси-5,6-дигидропроизводные VIII (см. стр. 330), в которых N-гликозидная связь весьма лабильна[35–37] и легко расщепляется при мягкой кислотной обработке:

VIII

Заместители в углеводном остатке. Пространственное расположение гидроксильных групп в углеводных остатках 1-(β-*D*-пентозофуранозилурацилов, по-видимому, не оказывает существенного влияния на степень лабильности по отношению к кислотному гидролизу N-гликозидной связи, поскольку 1-(β-*D*-арабинофуранозил)- и 1-(β-*D*-ликсофуранозил)-урацилы столь же устойчивы в условиях гидролиза, как и сам уридин[8]. В ряду 1-(2′-дезокси-β-*D*-пентозофуранозил)-урацилов было показано, что 1-(2′-дезокси-β-*D*-ликсофуранозил)-урацил IX гидролизуется кислотой с заметно большей скоростью, чем 2′-дезоксиуридин (см. табл. 8.2).

IX

Возможно, что это различие обусловлено особенностями конформации дезоксиликсофуранозильных производных.

Как уже указывалось выше (см. стр. 489), введение электроноакцепторных заместителей в углеводный остаток понижает, а удаление гидроксильных групп значительно повышает скорость кислотного гидролиза гликозидных связей в пиримидиновых производных. N-Гликозидные связи в фосфорилированных 2′-дезоксирибозилпиримидинах в условиях кислотного гидролиза значительно более устойчивы, чем в соответствующих нуклеозидах[23, 24] (см. стр. 492); эта устойчивость возрастает при переходе от моно- к дифосфатам. Такая закономерность связана, по-видимому, с тем, что недиссоциированные (в условиях кислотного гидролиза) фосфатные группы являются довольно сильными электроноакцепторными заместителями, поскольку атом фосфора в них несет частичный положительный заряд.

Противоположное влияние на стабильность гликозидной связи в производных уридина оказывает наличие 3′,5′-циклофосфатной группировки[38, 39]. Уридин-3′,5′-циклофосфат X очень быстро гидролизуется 1 н. соляной кислотой (при 100° С время полупревращения составляет 8 *мин*), причем основным продуктом гидролиза является урацил (67%)[38].

X

Аналогично ведет себя тимидин-3′,5′-циклофосфат[39], но не цитидин-3′,5′-циклофосфат, дающий в этих условиях лишь следы цитозина[38]. Такая значительная лабилизация N-гликозидных связей в производных урацила, по-видимому, обусловлена особенностями конформации остатка сахара (см. стр. 131).

2. Влияние структурных факторов на кинетику гидролиза пуриновых производных

Заместители в ядре. N-Гликозидные связи в производных гуанина более лабильны к действию кислот, чем в производных аденина, причем это характерно как для рибо-, так и для дезоксирибосоединений (см. табл. 8.3 и рис. 8.1). Данное различие в устойчивости по отношению к кислотам увеличивается с повышением pH.

Ряд изменений в экзоциклических заместителях аденинового и гуанинового ядер вызывает уменьшение стабильности N-гликозидных связей в их производных. Как видно из данных табл. 8.5, замена аминогрупп в ядрах аденина и гуанина на гидроксильные приводит к значительному понижению прочности N-гликозидных связей; при этом производные ксантина (замещение в ядре гуанина) гидролизуются легче, чем производные гипоксантина (замена в ядре аденина).

Таблица 8.5. **Кислотный гидролиз при pH 3,35 и 37°C дезоксиаденозина, дезоксигуанозина и их дезаминированных производных (k_1 — константы скорости гидролиза первого порядка)**

XI

XII

Исходное соединение	Формула	k_1, *сек*$^{-1}$	Литература
2′-Дезоксиаденозин	XI (R=NH_2; R′=H)	$2{,}3 \cdot 10^{-7}$	9
2′-Дезоксигуанозин	XII (R=NH_2; R′=H)	$7{,}7 \cdot 10^{-6}$	9
2′-Дезоксиксантозин-5′-фосфат	XII (R=OH; R′=PO_3H_2)	$3 \cdot 10^{-6}$	40
2′-Дезоксиинозин-5′-фосфат .	XI (R=OH; R′=PO_3H_2)	$9{,}7 \cdot 10^{-5}$	40

Еще большее влияние на прочность N-гликозидных связей оказывает алкилирование пуринов по атомам N-3 и N-7 (табл. 8.6; см. также стр. 362) [41–56].

Наличие заместителей по N-3 и N-7 в ядрах гуанина и аденина влияет и на скорость гидролиза ДНК, содержащей такие замещенные основания (гидролиз при pH 7,2 и 37° C) [47]:

Отщепляющийся пурин	Время отщепления половинного содержания основания, *ч*
3-($HOCH_2CH_2SCH_2CH_2$)-Аденин . .	8
3-Метиладенин	25
3-($HOCH_2CH_2SCH_2CH_2$)-Гуанин . .	50
7-Метилгуанин	140

В ряду производных дезоксигуанозина введение заместителей по N-7 вызывает очень значительную лабилизацию N-гликозид-

ных связей[41–50]. Как видно из данных табл. 8.6, N-7-замещенные дезоксигуанозины уже в нейтральной среде при достаточно низких температурах гидролизуются с заметной скоростью (примерно в 10 тыс. раз быстрее, чем сам дезоксигуанозин). Природа заместителя при N-7 оказывает определенное влияние на скорость гидролиза, которая возрастает в ряду

$$C_2H_5\text{-} < CH_3\text{-} < HOCH_2CH_2SCH_2CH_2\text{-} \text{ и } CH_3\text{-} < C_6H_5CH_2\text{-}$$

Причиной лабильности N-гликозидной связи в 7-N-замещенных дезоксигуанозинах является, по-видимому, сопряжение электронов N-гликозидной связи с катионным центром на N-7. Остается, однако, непонятным, почему в ряду гуанозина аналогичное замещение по N-7 в значительно меньшей степени влияет на лабильность N-гликозидной связи к кислотному гидролизу[47, 51, 54, 55] (см. табл. 8.6).

В еще большей степени (чем 7-N-замещенные дезоксигуанозина) неустойчива гликозидная связь в 3-N-[47, 54, 56] и 7-N-замещенных дезоксиаденозинах[56]. Так, расщепление гликозидной связи в 3- и 7-метилдезоксиаденозин-5′-фосфатах XIV и XV на 50% проходит при pH 7 и 37° С за 1,5 ч[56] (см. также стр. 496).

В то же время в 1-N-метиладенозине XVI и 6-*экзо*-N-метиладенозине XVII устойчивость гликозидной связи лишь незначительно отличается от таковой в самом аденозине[49, 50, 52, 53] (табл. 8.7). Причины этих различий не вполне ясны.

XIV

XV

XVI

XVII

32 Зак 614

Таблица 8.6. **Влияние заместителей при N-7 на лабильность к кислотному гидролизу N-гликозидных связей в производных гуанина**

XIII

Исходное соединение XIII	R	R′	R″	pH среды	Температура реакции, °C	Время полупревращения, ч	$k_1 \cdot 10^5$, $сек^{-1}$	Литература
Гуанозин	H	OH	H	0	37	1,9	10	9
7-Метилгуанозин	CH_3	OH	H	0	37	7,1	2,7	47
7-Этилгуанозин	C_2H_5	OH	H	0	37	9,9	2,0	47
7-Метилгуанозин	CH_3	OH	H	0	50	1,6	12,0	49
7-Бензилгуанозин	$C_6H_5CH_2$	OH	H	0	50	0,88	21	49
7-Метилгуанозин-5′-метилфосфат	CH_3	OH	PO(OH)–OCH_3	7,0	37	35	0,55	51
2′-Дезоксигуанозин	H	H	H	6,9	37	$9,1 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	9
7-Метил-2′-дезоксигуанозин-5′-фосфат	CH_3	H	$PO(OH)_2$	6,9	37	16	1,2	47
7-Этил-2′-дезоксигуанозин-5′-фосфат	C_2H_5	H	$PO(OH)_2$	6,9	37	19	1,0	47
7-($HOCH_2CH_2SCH_2CH_2$)-2′-дезоксигуанозин-5′-фосфат	$HOCH_2CH_2SCH_2CH_2$	H	$PO(OH)_2$	7,0	37	8,0	2,3	47
7-(β-Оксиэтил)-2′-дезоксигуанозин	$HOCH_2CH_2$	H	H	7,0	25	20	0,96	[illegible]

Таблица 8.7. **Влияние различных заместителей на лабильность к кислотному гидролизу (1 н. соляной кислотой) N-гликозидных связей в производных аденина**

XVIII

Исходное соединение XVIII	R	R′	R″	Температура реакции, °C	Время полупревращения, ч	$k_1 \cdot 10^5$, *сек*$^{-1}$	Литература
Аденозин	H	H	H	41	7,9	2,4	*52*
6-*экзо*-N-Метиладенозин	H	CH_3	H	41	7,9	2,4	*48*
6-*экзо*-N, N-Диметиладенозин	H	CH_3	CH_3	41	10,5	1,8	*53*
6-*экзо*-N-Изопентениладенозин	H	$(CH_3)_2C{=}CHCH_2$	H	41	6,0	3,2	*52*
1-Метиладенозин	CH_3	H	H	41	12,6	1,5	*48*
1-Изопентениладенозин	$(CH_3)_2C{=}CHCH_2$	H	H	41	11,5	1,7	*52*
1-Метиладенозин	CH_3	H	H	80	Полный гидролиз за 10 *мин*		*50*
1-Бензиладенозин	$C_6H_5CH_2$	H	H	80	Полный гидролиз за 5 *мин*		*50*

Заместители в углеводном остатке. Данные, позволившие бы оценить влияние различного пространственного расположения гидроксильных групп в сахарных остатках на прочность N-гликозидных связей, практически отсутствуют. Скорости гидролиза N-гликозидных связей в пуриновых нуклеотидах и соответствующих нуклеозидах различаются незначительно[9, 21], особенно в ряду производных аденина[9] (см. табл. 8.3). Фосфорилирование 7-N-замещенных дезоксигуанозина заметно стабилизует N-гликозидную связь, скорость кислотного гидролиза которой падает в ряду нуклеозид > нуклеозидмонофосфат > нуклеотидное звено в цепи

ДНК[47] (см. табл. 8.6 и стр. 496). Имеются, однако, данные, что скорости гидролиза аденозина, гуанозина и соответствующих 2′(3′)-монофосфатов в 6 н. соляной кислоте при 100° С примерно равны[21]. Показано также[38], что расщепление N-гликозидных связей в пуриновых рибонуклеозид-3′,5′-циклофосфатах протекает значительно медленнее, чем в соответствующих монофосфатах (гидролиз 1 н. соляной кислотой при 100° С):

Исходное соединение	Время полупревращения, *мин*
Аденозин-3′,5′-циклофосфат XIX . .	30
Гуанозин-3′,5′-циклофосфат XX . . .	28
Аденозин-5′- и аденозин-2′(3′)-фосфаты	2—4

XIX

XX

Эти различия связаны, по-видимому, с особенностями конформации пуриновых нуклеозид-3′,5′-циклофосфатов.

3. Кислотный гидролиз N-гликозидных связей в полинуклеотидах

При переходе от нуклеозидов и нуклеотидов к олиго- и полинуклеотидам основные закономерности, связывающие лабильность N-гликозидных связей по отношению к кислотному гидролизу со строением нуклеозидных звеньев, сохраняются (о влиянии фосфорилирования гидроксильных групп остатков сахаров см. стр. 495 и 499). Однако кислотный гидролиз N-гликозидных связей в полинуклеотидах сопровождается расщеплением фосфодиэфирных связей*, причем в полирибонуклеотидах эти два процесса могут протекать независимо, а в полидезоксирибонуклеотидах расщепление фосфодиэфирных связей под действием кислот протекает после отщепления основания от соответствующего нуклеотидного звена (подробнее — см. стр. 572).

* В кислой среде может происходить гидролиз фосфомоноэфирных связей также и в мононуклеотидах, см. стр. 542.

Отщепление гетероциклических оснований с одновременной деградацией полинуклеотидной цепи является основой ряда методов анализа нуклеотидного состава нуклеиновых кислот [57]. Например, для определения состава оснований как в ДНК, так и в РНК широко используется жесткий кислотный гидролиз, приводящий к расщеплению всех гликозидных связей. При этом полирибозо- или полидезоксирибозофосфатная цепь разрушается; углеводные остатки подвергаются деградации. Чаще всего применяется гидролиз 70%-ной хлорной кислотой (100° С, 1 *ч*), 98—100%-ной муравьиной кислотой (175° С, 2 *ч*), реже — для гидролиза ДНК — обработка 6 н. соляной кислотой (100° С, 3 *ч*, в атмосфере углекислого газа) [57]. Недостатком этих методов является частичное дезаминирование и разрушение гетероциклических оснований, что сказывается, естественно, на достоверности получаемых результатов [57]. В несколько более мягких условиях (нагревание с 0,2 н. серной кислотой, 100° С, 35 *мин*) ДНК может быть расщеплена [24] до пуриновых оснований и полипиримидиновых олигонуклеотидов * (подробнее см. 572). При обработке РНК 1 н. соляной кислотой (100° С, 1 *ч*) образуются пуриновые основания и пиримидиновые мононуклеотиды [57].

Для ДНК, но не для РНК, легко осуществимо отщепление пуриновых оснований (апуринизация) без существенного расщепления фосфодиэфирных связей (табл. 8.8).

Таблица 8.8. **Отщепление пуриновых оснований и гидролиз фосфодиэфирных связей в ДНК и РНК. Значения констант скоростей реакций при различных pH (37° С)[58].**

$k_ф$ — константа скорости первого порядка гидролиза фосфодиэфирных связей; $k_п$ — средняя константа скорости первого порядка отщепления пуриновых оснований (гуанин отщепляется быстрее аденина)

Исходный полинуклеотид	pH	$k_ф \cdot 10^6$, *мин*$^{-1}$	$k_п \cdot 10^6$, *мин*$^{-1}$	Исходный полинуклеотид	pH	$k_ф \cdot 10^6$, *мин*$^{-1}$	$k_п \cdot 10^6$, *мин*$^{-1}$
ДНК	2,4	6,6	780	РНК	2,4	6,4	1,2
	2,0	—	—		2,0	12,7	2,7
	1,8	—	—		1,8	15,8	3,2

Частичная апуринизация ДНК наблюдается [59] уже при нагревании ее водных растворов в интервале pH 6,1—7,3 при 65—100° С (в этих условиях происходит также частичное отщепление цитозина [59]).

---

* Показано, что в этих условиях происходит также частичное отщепление цитозина и тимина [24, 60]. Об использовании апуриновых ДНК для анализа частоты встречаемости различных полипиримидиновых последовательностей в ДНК см. стр. 575.

Для количественного отщепления пуринов из ДНК применяется обработка разбавленной соляной кислотой (pH 1,6; 37° С, 24 *ч*), 67%-ной муравьиной кислотой (37° С, 18 *ч*) [61, 62] или сульфокатионитами в H^+-форме [63]. Другим вариантом апуринизации является действие на ДНК тиольных соединений в присутствии кислот; при этом в цепи на месте пуриновых оснований возникают тиоацетальные группы.

RSH(H^+)

$R = C_2H_5$; CH_2COOH

Для этих целей были использованы этилмеркаптан в присутствии концентрированной соляной кислоты (18° С, 14 *ч*) [64, 65] и 98%-ная меркаптоуксусная кислота в присутствии хлористого цинка и сульфата натрия (37° С, 36 *ч*) [66]. Апуринизация ДНК с помощью каждого из перечисленных методов сопровождается некоторой деградацией фосфодиэфирных связей [4, 61–68], наименьшей при использовании 67%-ной муравьиной кислоты [61, 62].

Кислотный гидролиз может быть использован также для более избирательного удаления тех или иных пуриновых оснований из состава ДНК после их предварительной модификации. Так, после полного дезаминирования оснований в составе ДНК действием азотистой кислоты (см. стр. 416) при инкубации продукта при pH 3,35 и 37° С за 72 *ч* отщепляется 94% ксантина XXI (продукта дезаминирования гуанина) и только 22% гипоксантина XXII (продукта дезаминирования аденина [40]; см. также табл. 8.5):

XXI

XXII

В очень мягких условиях — при значениях pH, близких к нейтральному, и 37° С — от ДНК отщепляются пуриновые основания замещенные по N-3 и N-7 [41, 42, 45, 47, 54, 56]. Особенно быстро в этих условиях отщепляются 3-N-замещенные аденины [56] (см. стр. 496).

Для олиго- и полирибонуклеотидов, как уже отмечалось, отщепление обычных оснований под действием кислот сопровождается гидролизом фосфодиэфирных связей, причем последний процесс идет даже с несколько большей скоростью, чем первый (см. табл. 8.8). Для коротких олигонуклеотидов в некоторых случаях удается расщепить более лабильные к действию кислот гликозидные связи с сохранением (частичным) фосфоэфирных связей. Так, при кислотном гидролизе динуклеозидмонофосфата XpC удается выделить рибозил-(3' → 5')-цитидин [69]. Известен, однако, пример (правда, пока единственный) избирательного отщепления от РНК в условиях кислотного гидролиза необычного минорного компонента. Недавно было показано, что в составе фенилаланиновой тРНК из дрожжей имеется кислотолабильное основание, природа которого неизвестна [70]. При мягкой кислотной обработке (pH 2,9 при 37° С в течение 3—4 *ч*) это основание может быть отщеплено от тРНК без сколько-нибудь существенной деградации полинуклеотидной цепи [71].

III. РАСЩЕПЛЕНИЕ N-ГЛИКОЗИДНЫХ СВЯЗЕЙ В ПИРИМИДИНОВЫХ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДАХ, НЕ КАТАЛИЗИРУЕМОЕ КИСЛОТАМИ ИЛИ ОСНОВАНИЯМИ

N-Гликозидная связь в ряде пиримидиновых дезоксирибонуклеозидов (дезоксиуридине, тимидине и 5-бромдезоксиуридине) гидролизуется [11a] с заметной скоростью в нейтральной и слабокислой средах (pH 3—7). В этом интервале pH скорость гидролиза практически не зависит от pH и ионной силы среды (табл. 8.9).

Таблица 8.9. **Кинетические параметры гидролиза ряда пиримидиндезоксирибонуклеозидов в нейтральной и слабокислой средах при 95° С**

Исходное соединение	$k_1 \cdot 10^6$, *сек*$^{-1}$			ΔH, *ккал/моль*	ΔS, э. е.
	при pH 4	при pH 5,5	при pH 7,0		
2'-Дезоксиуридин . . .	3,0	3,1	3,0	32,1	+8,7
Тимидин	1,3	1,2	1,2	34,5	+3,5
5-Бром-2'-дезоксиуридин	53	57	50	32,4	+10,3

Как видно из табличных данных, электронодонорные заместители в положении 5 урацильного ядра понижают, а электроноак-

цепторные — повышают скорость гидролиза N-гликозидной связи по сравнению с самим дезоксиуридином. Величины логарифмов константы скорости гидролиза находятся в линейной зависимости от рK_a диссоциации протона при N-1 в соответствующих пиримидиновых основаниях. Исходя из этих данных, было высказано предположение, что реакция гидролиза протекает по мономолекулярному механизму.

IV. РАСЩЕПЛЕНИЕ N-ГЛИКОЗИДНЫХ СВЯЗЕЙ В ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЕ

N-Гликозиды, в частности нуклеозиды, как правило, устойчивы в щелочной среде. Известно, однако, несколько исключений из этого правила. Так, хотя гликозидные связи в пиримидиновых нуклеозидах устойчивы к действию 1 н. раствора NaOH при 100° С в течение 1 *ч*, аденозин, дезоксиаденозин и дезоксигуанозин (но не гуанозин) в этих условиях частично отщепляют гетероциклические основания [72]:

Исходное соединение	Степень расщепления гликозидной связи, %
Аденозин	28,5
2′-Дезоксиаденозин	23
Гуанозин	0
2′-Дезоксигуанозин	4,5

Имеются также данные о том, что частичный гидролиз гликозидных связей в дезоксиаденозине и дезоксигуанозине протекает при действии 1 н. раствора NaOH при 37° С в течение 48 *ч* [22]. Гораздо более лабильны к действию щелочей гликозидные связи в некоторых производных аденина. Так, в аденозин-3′,5′-циклофосфате XIX под действием 1 н. раствора NaOH [но не $Ba(OH)_2$] при 90° С необычайно легко происходит количественное отщепление аденина (время полупревращения 36 *мин*) [38, 73, 74].

В тех же условиях уридин-3′,5′-циклофосфат также частично отщепляет урацил [38]. Другое производное аденина — нуклеозидный антибиотик псикофуранин XXIII гидролизуется до аденина как под действием кислот, так и щелочей [75]; скорость щелочного гидролиза пропорциональна концентрации ионов OH^-. Механизмы всех этих реакций неизвестны.

XXIII

Другой тип гидролиза N-гликозидных связей под действием оснований известен для нуклеозидов, в которых гидроксильная группа при С-5′ заменена на сульфониевую. Например, 5′-дезокси-5′-диметилтиоаденозин XXIV и S-аденозилметионин XXV при действии разбавленных растворов щелочей на холоду отщепляют основание[76, 77].

XXIV (R= CH_3)

XXV (R= $CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$)

Аналогичная реакция известна также для производных уридина и инозина[77].

Для некоторых пуриновых нуклеозидов расщепление гликозидной связи происходит после раскрытия имидазольного цикла пурина под действием щелочей. Так, 9-(β-*D*-рибофуранозил)-пурин (небуларин) XXVI и его 6-метил-, 6-хлор- и 6-метилмеркаптопро-

XXVI

изводные при действии разбавленной щелочи сравнительно легко гидролизуются до соответствующих 5,6-диаминопиримидинов[78–80]. Подробнее о реакциях этого типа см. гл. 7.

V. ДРУГИЕ РЕАКЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К РАСЩЕПЛЕНИЮ ГЛИКОЗИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Расщепление гликозидных связей «непрямыми методами» может быть проведено либо путем предварительной деструкции гетероциклических оснований, либо после модификации углеводных остатков, приводящих к лабилизации N-гликозидных связей.

Деструкция оснований особенно широко используется в ряду пиримидиновых производных. Наиболее важными и широко применяемыми реакциями этого типа являются расщепление пиримидиновых оснований в составе нуклеозидов и нуклеотидов[3], а также РНК[81] и ДНК[82–85] гидразином и расщепление производных уридина (как мономерных, так и в составе РНК)[86–90] гидроксиламином (об условиях проведения и механизме этих реакций см. гл. 7, о применении — гл. 10). В результате деструкции оснований пиримидиннуклеотидные звенья в составе нуклеиновых кислот превращаются в рибозил(дезоксирибозил)-гидразинные или -гидроксиламинные звенья, в которых N-гликозидная связь легко расщепляется[84, 90, 91] при умеренно кислых значениях pH ($\sim$4).

Расщепление пиримидиновых оснований в составе РНК до рибозилмочевинных звеньев происходит также при действии концентрированных растворов перекиси водорода при pH 9—10[92]. В составе ДНК пиримидиновые основания могут быть разрушены, кроме того, обработкой окислителями — водными растворами $KMnO_4$[93, 94] и OsO_4[95]. При действии перманганата может происходить также побочное разрушение гуанина[94]. При окислении OsO_4 с наибольшей скоростью разрушается тимин[95] (подробнее о реакциях этого типа см. стр. 476).

Описано[96] специфическое удаление остатка цитозина из динуклеозидмонофосфата путем окисления до 3-N-окиси с последующей щелочной и кислотной обработками (подробнее см. 455).

Избирательное разрушение пуриновых оснований как в составе нуклеозидов и нуклеотидов, так и в нуклеиновых кислотах наблюдается при так называемых «фотодинамических реакциях» — облучении моно- или полинуклеотидов видимым светом в присутствии ряда акридиновых или тиазиновых красителей[97–100] (подробнее — см. гл. 12).

В ряде случаев ослабление гликозидной связи в нуклеозидах вызывается модификацией углеводного остатка. Так, периодатное окисление рибонуклеозидов, 5′-рибонуклеотидов и 3′-концевых рибонуклеотидных звеньев (со свободной OH-группой при C-3′), используемое при ступенчатой деградации полинуклеотидов (см. стр. 64 и 531), значительно лабилизует гликозидную связь.

Особым случаем периодатного окисления, приводящим к удалению основания, является окисление остатка псевдоуридина в составе РНК[102]. Гликозидная связь в этом случае не затрагивается (подробнее см. стр. 609).

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды отщепляются от продуктов периодатного окисления в сравнительно мягких условиях (pH 3, 37° C) в присутствии первичных аминов[101] или, еще легче, фенилгидразина[101]

$$\text{HOCH}_2\text{-рибозил-N} \xrightarrow{IO_4^-} \text{диальдегид} \xrightarrow{C_6H_5NHNH_2} \text{бис-фенилгидразон} \xrightarrow{H^+} \text{N-H}$$

Под действием производных карбодиимида[103] или уксусного ангидрида[104] в диметилсульфоксиде происходит отщепление оснований от дезоксинуклеозид-5′-фосфатов или олигодезоксинуклеотидов с нефосфорилированной концевой OH-группой при C-3′. В этих условиях OH-группа при C-3′ остатка дезоксирибозы окисляется до карбонильной и гетероциклические основания отщепляются по механизму β-элиминации *.

$$\text{ROCH}_2\text{-(3'-HO)-дезоксирибозил-N} \longrightarrow \text{ROCH}_2\text{-(3'-оксо)-дезоксирибозил-N} \longrightarrow \text{N-H}$$

R—замещенная или незамещенная фосфатная группа

Другим примером реакции отщепления основания в результате модификации остатка сахара может служить взаимодействие перекиси водорода в присутствии Fe^{3+} или разбавленных растворов гидроксиламина (генерирующих в присутствии кислорода воздуха перекисные радикалы) с нуклеозидами, нуклеотидами и полинуклеотидами[105–106]. Одним из происходящих при этом процессов является атака перекисными радикалами гликозидного атома C-1′ остатка сахара с окислением до производного рибоновой (дезоксирибоновой) кислоты[105–106]. Гликозидная связь в таких производных крайне лабильна, что приводит к отщеплению оснований[105, 106].

$$\text{HOCH}_2\text{-гликозил-N} + \cdot OOH \longrightarrow \text{HOCH}_2\text{-(1'-OH)-гликозил-N} \xrightarrow{H_2O} \text{HOCH}_2\text{-лактон (C=O)} + \text{N-H}$$

R = H или OH

* О применении этого метода для ступенчатой деградации ДНК см. стр. 66.

Легкость протекания этих реакций (в ряду дезоксирибонуклеозидов) зависит от природы основания и уменьшается в ряду $T > A > C > G$ [106]. Сходная реакция наблюдается при облучении ДНК видимым светом в присутствии солей железа [107] (см. гл. 12).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kossel A., Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt., **1891**, 181.
2. Kossel A., Neumann A., Ber., **26**, 2753 (1893); Z. phys. Chem., 22, 74 (1897).
3. Baron F., Brown D. M., J. Chem. Soc., **1955**, 2855.
4. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **195**, 49 (1952).
5. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **23**, 451 (1957).
6. Levene P. A., Jacobs W. A., Ber., **42**, 2469, 2703 (1909).
7. Levene P. A., Jacobs W. A., Ber., **44**, 1027 (1911).
8. Garrett E. R., Seydel J. K., Sharper A. J., J. Org. Chem., **31**, 2219 (1966).
9. Venner H., Hoppe-Sayler's Z. physiol. Chem., **339**, 14; (1964); **344**, 189 (1966).
10. Kenner G. W., in «Giba Foundation Symposium on Chemistry and Biology Purines», Little Brown a. Co., Boston, Mass., 1957, p. 312.
11. Isabelle H. S., Frush H. I., J. Org. Chem., **23**, 1309 (1958).
11a. Shapiro R., King S., Biochemistry, **8**, 1806 (1969).
12. Dekker C. A., Ann. Rev. Biochem., **29**, 453 (1960).
13. Micheel F., Heesing A., Chem. Ber., **94**, 1814 (1961).
14. Capon B., Connett B. E., Tetrahedron Letters, **1964**, 1395.
15. Capon B., Connett B. E., J. Chem. Soc., **1965**, 4497.
16. Simon H., Palm D., Chem. Ber., **98**, 433 (1965).
17. Preobrazhenskaya M. N., Vigdorchik N. N., Suvorov N. N., Tetrahedron, **23**, 4653 (1967).
18. Brown D. M., Fasman G. D., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 1448.
19. Wempen I., Doerr I. L., Kaplan L., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **82**, 1624 (1960).
20. Pfitzer K. E., Moffatt J. G., J. Org. Chem., **29**, 1508 (1964).
21. Wacker A., Träger L., Z. Naturforsch., **18b**, 13 (1963).
22. Greer S., Zamenhof S., J. Mol. Biol., **4**, 123 (1962).
23. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **39**, 62 (1960).
24. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **26**, 596 (1957).
25. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 34.
26. Khorana H. G., Turner A. F., Vissolyi J. P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 686 (1961).
27. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., ХПС, **1965**, 328.
28. Doerr I. L., Fox J. J., J. Org. Chem., **32**, 1462 (1967).
29. Levene P. A., La Forge F. B., Ber., **45**, 608 (1912); J. Biol. Chem., **13**, 508 (1912).
30. Hilbert G. E., Johnson T. B., J. Am. Chem. Soc., **52**, 5489 (1930).
31. Cohn W. E., Doherty D. G., J. Am. Chem. Soc., **78**, 2863 (1956).
32. Burke D. C., Chem. a. Ind., **1954**, 1393.
33. Laland S. G., Rothe E., Acta Chem. Scand., **10**, 1058 (1956).
34. Haaveldsen L., Laland S. G., McKee J. M., Roth E., Biochim. Biophys. Acta, **33**, 201 (1959).
35. Massart L., Hoste J., Biochim. Biophys. Acta, **1**, 83 (1947).
36. Brady T. G., McEvoy-Bowe F., Nature, **168**, 299 (1951).
37. Cohn W. E., Biochem. J., **64**, 28P (1956).

38. Smith M., Drummond G. I., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **83**, 698 (1961).
39. Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6223 (1958).
40. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochemistry, **5**, 3012 (1966).
41. Lawley P. D., in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», v. 5, Davidson J. N., Cohn W. E. (eds), p. 290, Acad. Press., N. Y. — L., 1966.
42. Reiner B., Zamenhof S., J. Biol. Chem., **228**, 475 (1957).
43. Lawley P. D., Proc. Chem. Soc. (London), **1957**, 290.
44. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1961**, 3923.
45. Lawley P. D., Brookes P., Nature, **192**, 1081 (1961).
46. Brookes P., Lawley P. D., Biochem., J., **80**, 496 (1961).
47. Lawley P. D., Brookes P., Biochem. J., **89**, 127 (1963).
48. Jones J. W., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., **85**, 193 (1963).
49. Windmuller H. G., Kaplan N. O., Biochim. Biophys. Acta, **61**, 307 (1962).
50. Brookes P., Dipple A., Lawley P. D., J. Chem. Soc., (C), **1968**, 2026.
51. Haines J. A., Reese C. B., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1962**, 5281.
52. Martin D. M., Reese C. B., J. Chem. Soc. (C), **1968**, 1731.
53. Kissman H. M., Pidacks C., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **77**, 18 (1955).
54. Kriek E., Emelot P., Biochim. Biophys. Acta, **91**, 59 (1964).
55. Захарян Р. А., Венкстерн Т. В., Баев А. А., Биохимия, 32, 1068 (1967).
56. Lawley P. D., Brookes P., Biochem. J., **92**, 19C (1964).
57. Уайатт Г., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Чаргаффа Э., Давидсона Дж., Издатинлит, 1957, стр. 443.
58. Pollman W., Schramm G., Z. Naturforsch., **16b**, 673 (1961).
59. Greer S., Zamenhof S., Fed. Proc., **18**, 238 (1959).
60. Jones A. S., Tittensor J. R., Walker R. T., Nature, **209**, 296 (1966).
61. Petersen G. B., Burton K., Biochem. J., **75**, 17 (1960).
62. Burton K., Petersen G. B., Biochem. J., **92**, 666 (1964).
63. Laland S. G., Acta Chem. Scand., **8**, 449 (1954).
64. Lucy J. A., Kent P. W., Research, **6**, 495 (1953).
65. Kent P. W., Lucy J. A., Ward P. F. V., Biochem. J., **61**, 529 (1955).
66. Jones A. S., Letham D. S., J. Chem. Soc., **1956**, 2573.
67. Hurlen E., Laland S. G., Cox R. A., Peacock A R., Acta Chem., Scand., **10**, 793 (1956).
68. Tamm C., Chargaff E., J. Biol. Chem., **203**, 689 (1953).
69. Witzel H., Ann., **620**, 126 (1959).
70. RajBhandary U. L., Chang S. H., Stuart A., Faulkner R. D., Hoskonson R. M., Khorana H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **57**, 751 (1967).
71. Thilbe R., Zachau H. G., Europ. J. Biochem., **5**, 546 (1968).
72. Jones A. S., Mian A. M., Walker R. T., J. Chem. Soc., (C), **1966**, 692.
73. Sutherland E. W., Rall T. W., J. Biol. Chem., **232**, 1077 (1958).
74. Lipkin D., Cook W. H., Markham R., J. Am. Chem. Soc., **81**, 6196 (1959).
75. Garrett E. R., J. Am. Chem. Soc., **82**, 827 (1960).
76. Parks L. W., Schlenk F., J. Biol., Chem., **230**, 295 (1958).
77. Frank W., Weiczotkowski J., Hughe N. A., Baddiley J., Proc. Chem. Soc. (London), **1961**, 449.
78. Gordon M. P., Weliky V. S., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3245 (1957).
79. Magrath D. I., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3252 (1957).

80. Brown G. B., Gordon M. P., Magrath D. I., Hampton A. «Ciba Foundation Simposium on Chemistry and Biology Purines», Litt[...] Brown a. Co., Boston, Mass., 1957, p. 192.
81. Takemura S., Miyazaki M., Bull. Chem. Soc., Japan, 32, 9261 (1959).
82. Takemura S., J. Biochem. (Japan), 44, 321 (1957); Biochim. Biophys. Acta, 29, 447 (1958); Bull. Chem. Soc. Japan, 32, 920 (1959).
83. Habermann V., Coll. Czech. Chem. Comm., 28, 510 (1963).
84. Temperli A., Türler H., Rüst P., Danon A., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 91, 462 (1964).
85. Будовский Э. И., Хейнс Д. А., Кочетков Н. К., ДАН СССР, 158, 379 (1964).
86. Freese E., Bautz-Freese E., Bautz E., J. Mol. Biol., 3, 133 (1961).
87. Schuster H., J. Mol. Biol., 3, 447 (1961).
88. Verwoerd D. W., Kohlage H., Zillig W., Nature, 192, 1038 (1961).
89. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Simukova N. A., Biochim. Biophys. Acta, 55, 255 (1962).
90. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Demushkin V. P., Turchinsky M. F., Simukova N. A., Sverdlov E. D., Biochim. Biophys Acta 142, 35 (1967).
91. Турчинский М. Ф., Гуськова Л. И., Будовский Э. И., М[...] биол., 1, 793 (1967).
92. Priess H., Zillig W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 342, 73 (1965).
93. Howgate P., Jones A. S., Tittensor J. R., J. Chem. Soc., (C), 1968, 275.
94. Jones A. S., Ross G. W., Takemura S., Tompson T. W., Walker R. T., J. Chem. Soc., 1964, 373.
95. Burton K., Riley W. T., Biochem. J., 98, 70 (1966).
96. Seidel H., Biochim. Biophys. Acta, 138, 98 (1967).
97. Simon M. I., Van Vunakis H., J. Mol. Biol., 4, 488 (1962); Arch. Biochem. Biophys., 105, 197 (1964).
98. Sussenbach J. S., Berends W., Biochim. Biophys. Acta, 76, 154 (1963).
99. Sastry K. S., Gordon M. P., Biochim. Biophys. Acta, 129, 42 (1966).
100. Friedman P. A., Biochim. Biophys. Acta, 166, 1 (1968).
101. Khym J. X., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 82, 638 (1960).
102. Tomasz M., Sano Y., Chambers R. W., Biochemistry, 4, 1710 (1965).
103. Cook A. F., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., 89, 2697 (1967).
104. Gabriel T., Chen W. Y., Nussbaum A. L., J. Am. Chem. Soc., 90, 6833 (1968).
105. Raese H.-J., Freese E., Biochim. Biophys. Acta, 155, 476 (1968).
106. Raese H.-J., Freese E., Melzer M. S., Biochim. Biophys. Acta, 155, 491 (1968).
107. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, 4, 227 (1965).

РЕАКЦИИ УГЛЕВОДНЫХ ОСТАТКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

I. ВВЕДЕНИЕ

В молекулах ДНК все функциональные группы углеводных остатков нуклеотидных звеньев, находящихся в середине полимерной цепи, замещены и свободными являются лишь гидроксильные группы концевых остатков дезоксинуклеотидов. В большинстве случаев природные дезоксиполинуклеотиды и дезоксиолигонуклеотиды — продукты их расщепления — содержат на 5′-конце цепи (см. примечание на стр. 44) остаток фосфорной кислоты. Таким образом, единственной свободной функциональной группой углеводных остатков является гидроксильная группа 3′-концевого остатка нуклеотида. В циклических ДНК даже эта единственная группа отсутствует. В противоположность этому в молекулах РНК каждое нуклеотидное звено, находящееся в середине полимерной цепи, содержит свободную гидроксильную группу при С-2′ остатка рибозы, а 3′-концевой нуклеотид цепи имеет незамещенную 2′,3′-*цис*-гликольную группировку. В аминоацил-тРНК по одной из гидроксильных групп 3′-концевого остатка нуклеотида присоединяется сложноэфирной связью остаток аминокислоты.

Для гидроксильных групп моносахаридов и их производных характерны три типа реакций (подробнее см.[1]): замещение атома водорода гидроксильной группы под действием электрофильных агентов; окисление, приводящее к образованию кетонной группы или расщеплению С—С-связи, и, наконец, замещение у атома углерода под действием нуклеофильных агентов.

В производных нуклеиновых кислот наиболее исследованы реакции первой группы — ацилирование и алкилирование по гидроксильной группе остатка сахара, а также реакции присоединения к олефинам с поляризованной двойной связью, например, к виниловым эфирам. Эти реакции применяются для определения концевых групп в олигодезоксирибонуклеотидах (см. гл. 1), а также для изучения вторичной структуры и функциональных исследований в ряду полирибонуклеотидов, особенно тРНК. Очень важное значение имеют реакции такого типа для мономерных компонентов нуклеиновых кислот: нуклеозидов и нуклеотидов, где они

используются для введения защитных группировок в углеводный остаток.

Нужно отметить, что гидроксильные группы углеводных остатков в полинуклеотидах не являются единственными или даже наиболее нуклеофильными центрами молекулы: действие электрофильных агентов может затрагивать, кроме того, атомы азота гетероциклического ядра (см. гл. 5), экзоциклические аминогруппы (см. гл. 6) или кислород остатка фосфорной кислоты (см. гл. 10). Поэтому для проведения избирательной модификации именно по гидроксильным группам углеводного остатка требуется тщательный подбор условий реакции.

Окисление изолированной гидроксильной группы в олиго- и полинуклеотидах находит некоторое применение для определения концевых последовательностей в олигодезоксинуклеотидах (см. гл. 1). В ряду рибонуклеотидов гораздо шире используется для этой цели окисление *цис*-гликольной группировки с помощью периодата.

Реакции нуклеофильного замещения у атома углерода характерны, вообще говоря, не столько для углеводов со свободной гидроксильной группой, сколько для производных углеводов, например эфиров сульфоновых кислот или галоиддезоксисахаров. Такие реакции широко используются в ряду нуклеозидов для получения производных с измененной структурой углеводного остатка (обзоры — см.[2,3]). Однако провести подобные реакции не только с олиго- или полинуклеотидами, но даже с мононуклеотидами до сих пор не удалось *.

Наконец, природные полинуклеотиды могут быть переведены расщеплением гетероциклических ядер составляющих звеньев (см. гл. 7) или N-гликозидных связей (см. гл. 8) в полимеры, в которых часть углеводных остатков содержит свободные гликозидные центры. Свойства таких полинуклеотидов изучены довольно слабо; наиболее характерная для них реакция — легкое расщепление полинуклеотидной цепи за счет β-элиминации — рассмотрена в гл. 10.

II. АЦИЛИРОВАНИЕ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП УГЛЕВОДНЫХ ОСТАТКОВ

1. Ацилирование

Нуклеозиды и нуклеотиды. Для получения полностью ацилированных по углеводному остатку производных нуклеозидов используют обычно действие ангидридов или хлорангидридов уксусной

---

* Единственным исключением является, по-видимому, работа Микельсона[4], в которой описано мезилирование уридин-2′,3′-циклофосфата и превращение 5′-О-мезилуридин-2′,3′-циклофосфата в соответствующие 5′-дезокси-5′-тиоацетил-, 5′-дезокси-5′-бром- и 5′-дезокси-5′-иодпроизводные.

или бензойной кислоты в безводном пиридине. В случае производных аденозина[5–7], гуанозина[5, 7–10], уридина[11, 12] и тимидина[12–14] гладко образуются соответствующие полные O-ацетаты или O-бензоаты; в случае же цитидина дело осложняется легкостью ацилирования аминогруппы (см. гл. 6). Эта побочная реакция может быть подавлена проведением ацилирования в присутствии кислотного катализатора. Так, например, описано получение 5′-O-ацетилцитидина нагреванием нуклеозида с уксусным ангидридом в ледяной уксусной кислоте[15].

Упомянутые выше условия — действие ангидрида кислоты в безводном пиридине — являются, по-видимому, вполне удовлетворительными для ацилирования гидроксильных групп и в нуклеотидах (см., например,[16, 17]). Образующийся при этом в первую очередь смешанный ангидрид нуклеотида и карбоновой кислоты легко расщепляется при обработке водным пиридином.

Ацетилирование гидроксильной группы углеводного остатка в дезоксирибонуклеозид-5′-фосфатах гладко протекает[18] под действием уксусного ангидрида в водной среде при pH 7. В этих условиях гетероциклическое основание не ацилируется даже в случае производных цитидина. При аналогичном ацилировании рибонуклеозид-3′-фосфатов за счет внутримолекулярного фосфорилирования 2′-гидроксильной группы в смешанном ангидриде I в значительных количествах образуются циклические фосфаты.

$HOCH_2$, B; O, OH; O=P—OH, OH $\xrightarrow[-AcOH]{Ac_2O}$ $HOCH_2$, B; O, O—H; O=P—OH, OAc $\underset{-AcOH}{\overset{AcOH}{\rightleftarrows}}$ $HOCH_2$, B; O, O; P; O, OH

I

B—остаток основания

Эту побочную реакцию удается полностью подавить, проводя ацилирование в присутствии избытка ацетат-иона. При этом гладко образуется 2′,5′-ди-O-ацетилуридин-3′-фосфат[19] и 2′,5′-ди-O-ацетиладенозин-3′-фосфат[20] (в зависимости от исходного нуклеотида). В случае цитидин- и гуанозин-3′-фосфатов происходит также ацилирование остатка основания[21]; аналогичная реакция наблюдается и при бензоилировании в сходных условиях аденозин-3′-фосфата[20].

Первичная гидроксильная группа в остатке моносахарида нуклеозида легче подвергается ацилированию, чем вторичная; это

33 Зак. 614

различие особенно четко выражено в ряду дезоксинуклеозидов[7]. Избирательность реакции можно повысить, применяя для ацилирования производные кислот, содержащих объемистый алкильный радикал. Так, ацилирование 2′-О-тетрагидропиранилпроизводных уридина, аденозина и N-ацетилцитидина действием пивалилхлорида (хлорангидрида триметилуксусной кислоты) приводит к соответствующим 5′-О-пивалил-2′-О-тетрагидропиранилнуклеозидам II[22], защищенным производным, используемым в полинуклеотидном синтезе.

$HOCH_2$ … $\xrightarrow{(CH_3)_3CCOCl\ (C_5H_5N)}$ $(CH_3)_3CCOOCH_2$ …

B—остаток основания

II

При моноацетилировании 5′-О-замещенных производных уридина и аденозина образуется смесь 2′-О- и 3′-О-ацетатов в соотношении 2 : 1[23]; эти соединения, однако, крайне легко переходят друг в друга[24, 25], в результате чего образуется равновесная смесь с преобладанием 3′-О-изомера (после кипячения в пиридине в течение 1 *ч* соотношение 2′-О- и 3′-О-ацетатов составляет приблизительно 1 : 3). При кристаллизации смеси диацетатов, полученных частичным ацетилированием 5′-О-ацетилуридина, удается с почти количественным выходом выделить 3′,5′-ди-О-ацетилуридин[26]:

$AcOCH_2$ … $\xrightarrow{Ac_2O(C_5H_5N)}$ $AcOCH_2$ … $\underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}}$ $AcOCH_2$ …

B—остаток урацила

Изомеризация 2′- и 3′-О-ацильных производных рибонуклеозидов быстро протекает в безводном пиридине[24]; еще быстрее реакция проходит в водных растворах при pH около 7 (табл. 9.1).

Во всех исследованных случаях равновесие сдвинуто в сторону образования 3′-изомера. Скорость реакции сильно зависит от природы ацильного остатка[24], скорости изомеризации бензоатов, ацетатов и формиатов относятся как 1 : 18 : 670. Некоторое влияние оказывает и природа гетероциклического основания: производные аденозина изомеризуются на 10—15% быстрее, чем производные уридина.

Для специфического получения 2′(3′)-О-моноацилнуклеозидов удобно использовать расщепление 2′,3′-циклических ортоэфиров III под действием разбавленных кислот [27, 28].

0,01н. HCl

III

В—остаток основания; R=H или CH_3

Структура выделяемого продукта зависит от скорости изомеризации ацильных производных и от их способности к кристаллизации.

Таблица 9.1. **Изомеризация и гидролиз 3′-О-ацилрибонуклеозидов (20° С, 0,1 *М* фосфатный буфер, рН 7,0)[25]**

Ацилнуклеозид	Изомеризация		Гидролиз
	k_1+k_2, *мин*$^{-1}$	k_1/k_2	$k_{гидр}$, *мин*$^{-1}$
3′-О-Ацетилуридин	5,4 $1{,}21 \cdot 10^{-3}$ *	1,7 1,7	$1{,}54 \cdot 10^{-5}$
3′-О-Ацетиладенозин	$1{,}41 \cdot 10^{-3}$ * $1{,}56 \cdot 10^{-3}$ **	2,7 3,0	$1{,}71 \cdot 10^{-5}$
3′-О-Формиладенозин	8,82 * 11,3 **	4,3 4,6	$3{,}95 \cdot 10^{-3}$

* Смесь 0,1 *М* фосфатного буфера с диметилсульфоксидом (8 : 1).
** Смесь 0,1 *М* фосфатного буфера с диметилформамидом (8 : 1).

Из О-ацилнуклеозидов и нуклеотидов могут быть легко регенерированы исходные незамещенные нуклеозиды и нуклеотиды. Для отщепления О-ацильных групп обычно применяют обработку водным аммиаком или метилатом натрия в метаноле. Предложены и более мягкие условия деацилирования [29] — длительное выдерживание в триэтиламмонийбикарбонатном буфере при рН 7,5 или кратковременное действие щелочного раствора гидроксиламина. Из данных табл. 9.1 видно, что 2′(3′)-О-моноацилнуклеозиды быстро расщепляются в водных растворах при рН 7. Скорость отщепления О-ацильных групп зависит от природы остатка кислоты, увеличиваясь по мере увеличения отрицательного индуктивного эффекта [30] (табл. 9.2).

Большое внимание уделяется получению ацильных производных нуклеозидов с ацильной группой, легко отщепляющейся в мягких условиях. В синтезе олигонуклеотидов предложено использовать О-формильные [31], О-трифторацетильные [32], О-метоксиацетильные [33] и О-(β-бензоил)-пропионильные [34] производные нуклеозидов *, а также различные алкил- и арилкарбонаты [35—39] или 2′,3′-циклические карбонаты рибонуклеозидов [37, 40].

Таблица 9.2. **Гидролиз 5′-О-ацил-2′,3′-О-изопропилиденуридинов IV в водном растворе при 20°С[30]**

IV

R	pH среды	Время полупревращения, *мин*
C_6H_5	11,0	680
CH_3	11,6	100
H	11,2	1,75
CH_2Cl	10,0	22
	11,0	1—2
CCl_3	8,2	1,5
CF_3	7,0	3
	7,0	Мгновенно

Олиго-и полинуклеотиды. Как уже отмечалось выше, первичным продуктом ацетилирования нуклеотидов является смешанный ангидрид нуклеотида и уксусной кислоты, внутримолекулярный алкоголиз которого может приводить в случае олигорибонуклеотидов к изомеризации или расщеплению фосфодиэфирной связи. Хотя нуклеофильность фосфодиэфиров значительно ниже, чем у моноэфиров, опасность таких побочных процессов при ацилировании олигорибонуклеотидов вполне реальна. На примере уридилил-(3′→5′)-уридина было показано [41], что при действии уксусного ангидрида в пиридине происходит расщепление динуклеозидфосфата на 30%, а оставшийся продукт содержит 21% (2′→5′)-изомера; при ацетилировании в присутствии HCl расщепление проходит на 50%, а изомеризация на 43%. Вместе с тем при проведении реакции в присутствии триэтиламина или тетраэтиламмонийацетата количественное ацетилирование гидроксильных групп не сопровождается сколько-нибудь заметной изомеризацией или деградацией фосфодиэфирной связи. Такие условия были успешно применены для защиты гидроксильных групп в динуклеозидфосфатах [42], од-

---

* Недавно предложены для этой цели О-производные дигидрокоричной кислоты [194]; такие сложные эфиры расщепляются под действием химотрипсина

нако при этом одновременно наблюдается ацетилирование аминогрупп гетероциклических оснований. Побочной реакции по аминогруппам удается избежать, проводя ацетилирование действием уксусного ангидрида в водном растворе при pH 7. Олигодезоксинуклеотиды гладко превращаются в этих условиях в соответствующие 5′-О-ацетаты[18], что позволяет применить реакцию ацетилирования для определения концевых гидроксильных групп в дезоксиолигомерах.

Аналогичные условия оказались пригодными для ацетилирования полирибонуклеотидов[43]. Удобнее проводить ацетилирование в 5%-ном водном диметилформамиде[44], что обеспечивает гомогенность реакционной смеси и лучшую воспроизводимость результатов модификации. С помощью этого метода удалось провести частичное ацетилирование полиуридиловой и полиадениловой кислот[45], а также суммарной тРНК из дрожжей[43, 44] без сколько-нибудь заметной деградации полимеров. Модификация тРНК с помощью ацетилирования была применена при изучении вторичной структуры и функциональных исследованиях тРНК и полирибонуклеотидов.

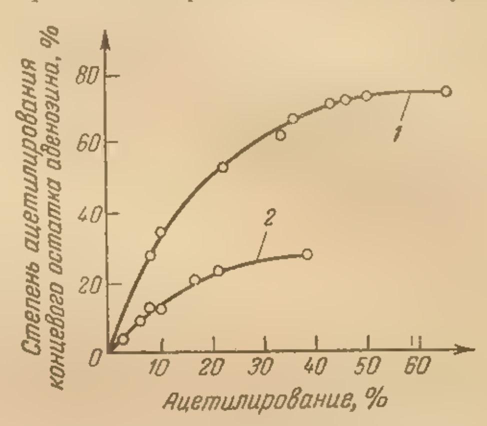


Рис. 9.1. Зависимость степени ацетилирования концевой *цис*-гликольной группировки от общей степени ацетилирования суммарной тРНК из дрожжей[46]:

1 — реакция проводилась в 5%-ном диметилформамиде; *2* — то же, в присутствии 0,2 *М* бората натрия.

Степень ацетилирования гидроксильных групп тРНК в данных условиях однозначно определяется начальной концентрацией уксусного ангидрида; легко можно получить препараты тРНК, в которых проацилировано до 70% гидроксильных групп. В присутствии ионов Mg^{2+}, стабилизующих вторичную структуру тРНК, скорость ацетилирования несколько снижается, однако предельная степень ацилирования при этом существенно не меняется[44]. Изменение условий проведения реакции заметно влияет на распределение ацетильных групп в полимере[46] (рис. 9.1). Препараты частично ацетилированной тРНК, имеющие одинаковую общую степень ацилирования, но полученные в разных условиях, обладают различной акцепторной активностью.

При ацетилировании суммарной тРНК из дрожжей[43] происходит быстрое уменьшение величины гиперхромного эффекта и изменение константы седиментации, что свидетельствует о разрушении вторичной структуры, которая полностью исчезает при ацетилировании 25—30% гидроксильных групп[44]. Частично ацетилированная полиадениловая кислота сохраняет способность к

образованию комплексов с полиуридиловой кислотой. С другой стороны, ацетилированная поли-U образует комплекс с поли-А с соотношением компонентов 1 : 1, заметно менее устойчивый, чем комплекс (поли-А) · (поли-U); комплекса с соотношением поли-А к поли-U, равным 1 : 2, ацетилированная поли-U не образует[45].

Различное поведение продуктов ацетилирования поли-А и поли-U наблюдается и в отношении их способности стимулировать связывание аминоацил-тРНК с рибосомами[47]. Полностью ацетилированная поли-А столь же эффективна в отношении связывания lys-тРНК с рибосомами, как и необработанный полимер. В то же время поли-U, ацетилированная на 88%, неактивна в отношении phe-тРНК. Оба ацетилированных полимера неактивны как матрицы в бесклеточной системе биосинтеза белка. Потеря акцепторной активности у тРНК наблюдается уже при небольшой степени ацетилирования[44] и связана, по-видимому, не с ацетилированием концевой *цис*-гликольной группировки, а с изменением вторичной структуры полимера. Фосфодиэфирная связь в ацетилированных полирибонуклеотидах устойчива к действию панкреатической пиримидил-РНК-азы[43] и фосфодиэстеразы селезенки[48], но расщепляется под действием фосфодиэстеразы змеиного яда[48].

Ацетильные группы в модифицированной тРНК могут быть легко удалены действием разбавленного (0,4 *М*) раствора гидроксиламина (при pH 10 и 37° С константа скорости псевдопервого порядка составляет $3{,}6 \cdot 10^{-3}$ *мин*$^{-1}$). При этом происходит восстановление акцепторной активности тРНК[46].

2. Аминоацилирование *

Как уже упоминалось выше, в аминоацил-тРНК остаток аминокислоты связан сложноэфирной связью с одним из гидроксилов *цис*-гликольной группировки 3′-концевого остатка аденозина в нуклеотидной последовательности. В связи с изучением строения и свойств аминоацил-тРНК большое внимание исследователей привлекает получение соответствующих модельных соединений.

Для аминоацилирования гидроксильной группы в нуклеозидах и нуклеотидах разработаны четыре основных метода. Исторически первый из них основан на взаимодействии нуклеозид-5′-фосфатов с тиофениловыми эфирами аминокислот в диметилформамиде[50–52]. При этом с выходами 10—15% образуются соответствующие 2′(3′)-О-аминоацилнуклеозид-5′-фосфаты, которые действием фосфатазы

---

* Обзор — см.[49].

могут быть переведены в соответствующие 2′(3′)-O-аминоацилнуклеозиды.

$$(HO)_2P(O)OCH_2\text{-нуклеозид(B)}(2'\text{-}OH, 3'\text{-}OH) + NH_2CH(R)COSC_6H_5 \longrightarrow (HO)_2P(O)OCH_2\text{-нуклеозид(B)}(2',3'\text{-}O\text{: H, }COCH(R)NH_2)$$

B—остаток основания; R—алкильный радикал

Гораздо более высокие выходы O-аминоацильных производных достигаются при конденсации N-карбобензоксиаминокислот с защищенными нуклеозидами в присутствии дициклогексилкарбодиимида[53—55] или при взаимодействии ангидрида N-карбобензоксиаминокислоты с нуклеозидом[56]. При проведении реакции в абсолютном пиридине аминогруппы гетероциклических оснований не затрагиваются. Защитные группы с остатков нуклеозида и аминокислоты могут быть удалены при обработке кислотой и гидрогенолизе; в этих условиях O-аминоацильные производные нуклеозидов достаточно устойчивы.

$$TrOCH_2\text{-нуклеозид(B)}(2'\text{-}OH, 3'\text{-}OH) + HOOCCH(R)NH\text{-кбз} \longrightarrow$$

$$TrOCH_2\text{-нуклеозид(B)}(2',3'\text{-}O\text{: H, }COCH(R)NH\text{-кбз}) \xrightarrow[2.\ H_2/Pd]{1.\ HBr/AcOH} HOCH_2\text{-нуклеозид(B)}(2',3'\text{-}O\text{: H, }COCH(R)NH_2)$$

B—остаток основания; R—алкильный или арильный радикал

При реакции с незащищенным нуклеозидом 5′-O-аминоацилирование протекает быстрее, чем реакция по вторичным гидроксильным группам.

Конденсация N-тритилглицина с суммарной тРНК из дрожжей под действием дициклогексилкарбодиимида в абсолютном пиридине приводит к продукту, в котором основная часть включенной аминокислоты соединена сложноэфирной связью с концевым остатком аденозина[57]. Эффективное аминоацилирование нуклеозидов и нуклеотидов может быть осуществлено при действии имидазолидов N-замещенных аминокислот[58, 59]; при использовании *трет*-бутилоксикарбонильной и формильной защитных групп реакция может быть проведена в водном растворе. В этих условиях аминогруппа цитидина не затрагивается. С помощью данного метода удалось осуществить аминоацилирование суммарной тРНК из дрожжей[60, 61], причем 60—65% остатков аминокислоты оказалось соединено с концевой *цис*-гликольной группировкой полимера.

Наконец, для специфического аминоацилирования *цис*-гликольной группировки предложен метод[62], основанный на образовании циклических ортоэфиров аминокислот (см. стр. 529) с их последующим превращением в O-аминоацильные производные (ср. стр. 515):

$$\text{нуклеозид (HOCH}_2\text{, B; HO, OH)} + (EtO)_3CCH_2NH\text{-кбз} \xrightarrow{CH_3SO_2OH}$$

$$\longrightarrow \text{ортоэфир (O, O; C; EtO, } CH_2NH\text{-кбз)} \xrightarrow{AcOH} \text{(O, O: H, } COCH_2NH\text{-кбз)} \longrightarrow \text{(O, O: H, } COCH_2NH_2\text{)}$$

B—остаток основания

Этот метод был успешно применен к олигонуклеотидам[63, 64]; использование его ограничивается, однако, труднодоступностью ортоэфиров аминокислот.

2′(3′)-O-Аминоацильные производные нуклеозидов и нуклеотидов крайне легко гидролизуются и изомеризуются в нейтральной или слабощелочной среде[52, 65—68]; по скорости изомеризации и гидролиза они сравнимы с 2′(3′)-O-формилнуклеозидами[25] (см. стр. 515). В связи с этим можно предполагать, что природные ами-

ноацил-тРНК представляют собой равновесную смесь 2′- и 3′-О-изомеров, хотя имеются данные, указывающие на сильное преобладание 3′-О-аминоацилпроизводных[69–71].

3. Получение эфиров с неорганическими кислотами

Гидроксильная группа остатка сахара в нуклеозидах и нуклеотидах может подвергаться ацилированию под действием производных кислот фосфора, серы, бора и кремния.

Лучше всего разработано фосфорилирование нуклеотидов. Для этой цели предложен целый ряд фосфорилирующих агентов — хлорангидридов или ангидридов замещенных фосфорных кислот, причем в ряде случаев последние получают непосредственно в реакционной смеси при действии соответствующих конденсирующих агентов (обзоры — см.[72, 73]). Наиболее мягкие агенты успешно применяются и для фосфорилирования олигонуклеотидов[74–81].

Взаимодействие свободных или частично защищенных нуклеозидов с хлорангидридами *п*-толуолсульфокислоты или метансульфокислоты в безводном пиридине приводит к эфирам нуклеозидов с соответствующими сульфоновыми кислотами[6, 13, 82–86]. При сульфонилировании 5′-замещенных рибонуклеозидов, содержащих незащищенную *цис*-гликольную группировку, предпочтительно образуются 2′-О-эфиры[87, 88]. В случае уридина[89] и тимидина[13] легко удается получить полностью сульфонилированные нуклеозиды. О превращении уридин-2′,3′-циклофосфата в 5′-О-мезилуридин-2′,3′-циклофосфат[4] уже упоминалось; в этом случае необходимо проводить реакцию в диоксане в присутствии три-*н*-бутиламина, так как в пиридине легко идет полимеризация фосфатов. В аналогичных условиях удалось провести мезилирование аденозин-2′,3′-циклофосфата[90]. Сульфоэфиры широко применяются в синтетической химии нуклеозидов для получения производных с измененным углеводным остатком.

Описано получение эфиров тимидина[91] и 2′-дезоксиаденозина[92] с 2,4-динитробензолсульфеновой кислотой; эти соединения представляют интерес как защищенные производные нуклеозидов. Их расщепление протекает в мягких условиях под действием таких нуклеофильных агентов, как тиосульфат, цианид или тиофенол.

Рибонуклеозиды с незамещенной *цис*-гликольной группировкой легко образуют комплексы с борной кислотой; эти комплексы, однако, слишком неустойчивы для того, чтобы их можно было использовать в качестве защитных группировок нуклеозидов[93]. Значительно успешнее оказалось использование фенилборной кислоты: при кипячении ее смесей в пиридине с нуклеозидами образуются фенилборонаты, которые удается выделить[94, 95] и

использовать в качестве защищенных производных при синтезе нуклеозид-5′-фосфатов [96] и -пирофосфатов [97].

$$\text{HOCH}_2\text{–(рибофураноза, 2',3'-OH)–R} \xrightarrow{C_6H_5B(OH)_2} \text{2',3'-O-}C_6H_5B\text{-производное}$$

R—остаток основания

Фенилборонатная группировка легко отщепляется при действии этиленгликоля или пропандиола-1,3.

Взаимодействие нуклеозидов и нуклеотидов с триметилхлорсиланом, гексаметилдисилазаном или N-бис-(триметилсилил)-ацетамидом в пиридине приводит к полностью замещенным (по гидроксильным группам углеводного остатка) О-триметилсилильным производным [98, 99]; в случае нуклеотидов реакция проходит также по кислородным атомам остатка фосфорной кислоты. Получающиеся триметилсилильные производные используются для газожидкостной хроматографии [98–102] и масс-спектрометрии [103] нуклеозидов и нуклеотидов. Реакцию удалось распространить на олигонуклеотиды [104]; в этом случае в качестве агента, вводящего силильную группировку, был использован N-бис-(триметилсилил)-трифторацетамид.

III. АЛКИЛИРОВАНИЕ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП УГЛЕВОДНЫХ ОСТАТКОВ

1. Взаимодействие с диазометаном

Как уже отмечалось (см. стр. 360), при взаимодействии нуклеозидов с диазометаном в первую очередь протекает алкилирование атомов азота гетероциклического ядра. Как побочная реакция при этом может наблюдаться и алкилирование гидроксильных групп остатка углевода; наиболее реакционноспособной является гидроксильная группа при С-2′ в рибонуклеозидах. Впервые получение производных 3,2′-диметилуридина — при действии диазометана на производные уридина — было описано в 1961 г. [105].

Особо благоприятные условия для О-алкилирования гидроксильных групп остатка сахара — действие диазометана в водном растворе 1,2-диметоксиэтана при нагревании [106, 107]. При этом аденозин [106–109] и цитидин [108] гладко превращаются в соответствующие 2′-О-метилнуклеозиды. Из реакционной смеси удается также вы-

делить присутствующие в меньших количествах 3′-O-метиладенозин[108, 109] и 3′-O-метилцитидин[108], а также незначительные количества 5′-O-метил- и 2′,3′-ди-O-метиладенозина[109].

2. Взаимодействие с галоидными алкилами

Гидроксильные группы нуклеозидов алкилируются под действием иодистого метила и окиси серебра в метаноле в условиях, близких к обычно применяемым для метилирования производных моносахаридов. Кроме того, наблюдается метилирование и гетероциклического основания (см. гл. 5). Было проведено исчерпывающее метилирование аденозина, гуанозина и уридина[110], а также уридин-3′-фосфата[111] и РНК[112]. Метилирование 3′,5′- и 2′,5′-ди-O-тритилуридинов было использовано[113] для синтеза 2′-O-метилуридина и 2′-O-метилцитидина (редких компонентов РНК) и соответствующих 3′-O-метилнуклеозидов.

Обработка производных уридина хлористым бензилом в присутствии щелочи приводит к соответствующим бензиловым эфирам[114–116]; в случае других нуклеозидов происходит также алкилирование по атомам азота гетероциклического ядра (см. стр. 370). Другой метод O-бензилирования — действие бромистого бензила в присутствии гидрида натрия в диметилсульфоксиде[117, 118] — также не свободен от указанного недостатка. Бензиловые эфиры нуклеозидов расщепляются гидрогенолизом над палладием в мягких условиях (при этом пиримидиновое ядро не затрагивается). Это

позволяет использовать 2′-О-бензилуридин в синтезе полинуклеотидов [115]; 3′-О-бензилуридин, полученный из 2′,5′-ди-О-тритилуридина, был успешно применен для получения 2′,5′-ди-О-ацилуридинов [116].

3. Взаимодействие с триарилхлорметанами

Обработка нуклеозидов трифенилхлорметаном в абсолютном пиридине приводит главным образом к замещению у первичной гидроксильной группы [6, 10–114, 119–125]; в аналогичных условиях могут быть получены и 5′-О-тритилнуклеозид-3′-фосфаты. В реакцию вступают и вторичные и гидроксильные группы, хотя и менее легко. Так, при тритилировании уридина удалось выделить 2′,5′-ди-О- [126] и 3′,5′-ди-О-тритилуридины [127] и даже небольшое количество 2′,3′,5′-три-О-тритилуридина [128, 129].

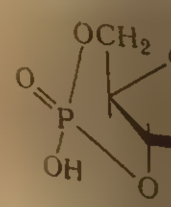
Трифенилметиловые эфиры расщепляются при действии разбавленной кислоты, что позволяет применять их для защиты гидроксильных групп в нуклеозидах и нуклеотидах. При использовании тритильных производных в синтезе олигорибонуклеотидов было обнаружено, однако, что в условиях отщепления защитных групп происходит заметная изомеризация фосфодиэфирной связи. Вследствие этого в настоящее время более широко используются метокситрифенилметильные производные нуклеозидов [10,130, 131] и нуклеозид-3′-фосфатов [19, 20], которые расщепляются в значительно более мягких условиях. С введением каждой *п*-метоксигруппы скорость кислотно-катализируемого гидролиза триариловых эфиров увеличивается приблизительно в 10 раз (табл. 9.3). Уже производные *п*-анизилдифенилкарбинола легко расщепляются при комнатной температуре в пиридин-ацетатном буфере [132].

Таблица 9.3. **Гидролиз 5′-О-триарилметилуридинов VI в 80%-ной уксусной кислоте при 20 °С** [130]

VI

R′	R″	R‴	Время, необходимое для полного гидролиза, *мин*
H	H	H	2880
OCH_3	H	H	120
OCH_3	OCH_3	H	15
OCH_3	OCH_3	OCH_3	1

Содержащие метоксигруппы триарилхлорметаны взаимодействуют с нуклеозидами быстрее, чем сам трифенилхлорметан, при этом наблюдается несколько меньшая избирательность реакции. Это касается как замещения по вторичным гидроксильным груп-



пам, так и N-тритилирования гетероциклических оснований, содержащих аминогруппу (см. стр. 422). Для подавления последней реакции предложено проводить триарилметилирование нуклеозидов и нуклеотидов в диметилформамиде в присутствии эквивалентного количества основания [21, 133]; при этом происходит протонирование гетероциклического основания, что понижает его нуклеофильность. Триарилметилирование первичной гидроксильной группы углеводного остатка может быть успешно выполнено и в случае олигонуклеотидов [42].

IV. РЕАКЦИИ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП УГЛЕВОДНЫХ ОСТАТКОВ С ВИНИЛОВЫМИ ЭФИРАМИ

Нуклеозиды и нуклеотиды, подобно обычным спиртам, способны в присутствии кислотных катализаторов присоединяться по двойной связи виниловых эфиров с образованием ацеталей:

$$>C=C-OR + R'-OH \longrightarrow >CH-C{<}^{OR}_{OR'}$$

R — алкильный радикал; R′ — остаток нуклеозида или нуклеотида

Впервые эта реакция была описана на примере взаимодействия дигидропирана с уридин-3′,5′-циклофосфатом [130, 134]; образующийся 2′-О-тетрагидропиранилуридин-3′,5′-циклофосфат VII может быть легко превращен в 5′-О-тритил-2′-О-тетрагидропиранилуридин-3′-фосфат VIII — нуклеотидный компонент, использовавшийся в первых синтезах олигорибонуклеотидов.

VII

VIII

B—остаток основания

Взаимодействие с дигидропираном было использовано для получения 2′-О-тетрагидропиранильных производных 5′-О-ацетилнуклеозид-3′-фосфатов [135] и 3′,5′-ди-О-ацетилнуклеозидов [22]; из незащищенных нуклеозидмонофосфатов образуются соответствующие ди-О-тетрагидропиранильные производные [136, 137]. Реакцию проводят обычно в растворе диоксана, диметилформамида или диметилсульфоксида; в качестве катализатора используют хлористый водород, *п*-толуолсульфокислоту или трифторуксусную кислоту.

Тетрагидропиранильная группа может быть отщеплена действием разбавленной уксусной кислоты, сульфокислотных катионитов в пиридиниевой или аммониевой форме[135] или 0,01 н. соляной кислоты[22]; изомеризация фосфодиэфирной связи в олигонуклеотидах при использовании последнего реагента незначительна.

Очень легко вступают в реакцию с нуклеозидами и нуклеотидами виниловые эфиры — производные ацетальдегида[138, 139]. Образующиеся 2′-О-(α-алкокси)-этилпроизводные расщепляются в более мягких условиях, чем тетрагидропиранильные эфиры; они с успехом используются при синтезе олигонуклеотидов. Реакция дигидропирана и винилэтилового эфира с динуклеозидфосфатами также протекает гладко и не сопровождается расщеплением или изомеризацией фосфодиэфирной связи[16, 41].

Недавно было предложено использовать для блокирования гидроксильных групп в нуклеозидах 4-метокси-5,6-дигидропиран[140, 195]; образующиеся производные типа IX могут быть расщеплены в чрезвычайно мягких условиях.

AcOCH₂ O B; AcO OH + OCH₃ (дигидропиран) → AcOCH₂ O B; AcO O; CH₃O; IX

B—остаток основания

При взаимодействии 3′,5′-ди-О-ацетилуридина с 2-метоксипропеном образуется смешанный кеталь X[140]; аналогично реагирует 1-метилциклогексен. Образующиеся кетали чрезвычайно лабильны в кислой среде: период полупревращения при гидролизе при pH 4,0 и 20° C составляет соответственно 4 и 10 *мин*. Подобные соединения могут быть получены и реакцией транскетализации: при обработке уридина 2,2-диметоксипропаном и ди-*п*-нитрофенилфосфатом избирательно образуется 5′-О-(α-метоксиизопропил)-уридин XI[141].

AcOCH₂ O B; AcO O—C(CH₃)(CH₃)—OCH₃; X

H_3C, OCH_3, C, H_3C, OCH_2 O B; HO OH; XI

B—остаток урацила

Аналогичные смешанные ацетали возникают при взаимодействии нуклеозидов и нуклеотидов со смесью альдегида и спирта в присутствии трифторуксусной кислоты[142]. В случае уридин-3'-фосфата первичная и вторичная гидроксильные группы реагируют приблизительно с одинаковой скоростью.

RCHO; R'OH (H^+)

B—остаток урацила; R и R'—алкильные радикалы

Описано взаимодействие 5'-О-ацетилтимидина с 2,3-дигидротиофеном[143]; получающийся полуацеталь-полутиоацеталь XII легко расщепляется в нейтральной среде при действии ионов серебра:

HCl; Ag^+

XII

B—остаток тимина

V. РЕАКЦИИ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП УГЛЕВОДНЫХ ОСТАТКОВ С КАРБОНИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И ИХ ПРОИЗВОДНЫМИ

Рибонуклеозиды, содержащие незамещенную *цис*-гликольную группировку, при реакции с альдегидами и кетонами в присутствии кислотных катализаторов образуют пятичленные циклические ацетали или кетали. Классическим примером такой реакции является образование 2',3'-О-изопропилиденовых производных XIII при реакции с ацетоном[83, 144–148]; в качестве катализаторов здесь обычно применяют хлористый водород, *п*-толуолсульфокислоту, серную или хлорную кислоту. Наилучшие результаты достигаются, однако, при использовании в качестве катализатора ди-*п*-нитрофе-

нилфосфата [149] и добавлении в качестве водоотнимающего средства кеталя ацетона [149] или ортомуравьиного эфира [150].

$(CH_3)_2CO$ → XIII

B–остаток основания

Реакция распространена на широкий круг кетонов различного строения. Образующиеся кетали расщепляются при мягком кислотном гидролизе; скорость их распада зависит от структуры исходного кетона (pH 2 и 26° C) [150, 151]:

2′, 3′-О-Заместитель	Время полупревращения при гидролизе, ч
Циклооктилиден	2,5
Циклогептилиден	3
Циклопентилиден	4
Метил-*трет*-бутилметилиден .	20
Изопропилиден	20
Диэтилметилиден	40
Дифенилметилиден	> 40

Аналогично протекает взаимодействие нуклеозидов с альдегидами [152, 153] (хотя первоначально продукту реакции с бензальдегидом [146, 154, 155] была приписана структура 3′,5′-О-бензилиденового производного):

$+ \ C_6H_5CHO \longrightarrow$ XIV

B–остаток основания

Для проведения реакции был предложен целый ряд кислотных катализаторов; в настоящее время чаще всего используют трифторуксусную кислоту. В зависимости от условий реакции можно выделить оба диастереомерных 2′,3′-О-бензилиденнуклеозида XIV [156]. Циклические ацетали нуклеозидов легко расщепляются в слабокислой среде; скорость гидролиза увеличивается при введении в ароматическое ядро заместителей с электронодонорными свойствами (табл. 9.4) [30, 153].

Специфичность взаимодействия альдегидов и кетонов с *цис*-гликольной группировкой рибонуклеотидов и легкость расщепления образующихся продуктов позволяют широко использовать эту реакцию для избирательной защиты гидроксильных групп. Она гладко протекает также с нуклеотидами и олигонуклеотидами.

Таблица 9.4. **Гидролиз 2′,3′-O-арилиденуридинов XV в 80%-ной уксусной кислоте при 25 °C**[30]

XV

Ar	Время, ч	Степень превращения, %
n-Хлорфенил-	72	10
Фенил-	20	20
n-Метоксифенил-	10	100
n-Диметиламинофенил- . .	1	50
2,4-Диметоксифенил- . . .	0,08	60

Примечание. В данных условиях 2′,3′-O-изопропилиденуридин за 20 ч расщепляется на 20%.

Обработка рибонуклеозидов ортоэфирами в присутствии кислоты приводит к циклическим ортоэфирам типа XVI[139, 157–159]:

$$+ \; RC(OR')_3 \longrightarrow$$

XVI

B—остаток основания; R = H, CH_3; R′ = CH_3, C_2H_5

Под действием разбавленной кислоты они легко превращаются в смесь 2′(3′)-моноацилрибонуклеозидов (см. стр. 515), последующая щелочная обработка приводит к регенерации *цис*-гликольной группировки.

При взаимодействии рибонуклеозидов с тетраметилортокарбонатом были получены 2′,3′-O-диметоксиметилиденнуклеозиды[196], превращающиеся в кислой среде в 2′,3′-O-карбонаты нуклеозидов.

VI. ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДНЫХ ОСТАТКОВ

1. Окисление изолированной гидроксильной группы

При обработке слабощелочных растворов нуклеозидов кислородом в присутствии платинового катализатора происходит избирательное окисление первичной гидроксильной группы[160, 161] с

образованием производных уроновых кислот:

В—остаток основания

Аналогичному превращению подвергаются тимидин-3′-фосфат и тимидилил-(3′→5′)-тимидин; в этом случае требуются существенно более жесткие условия, однако выходы продуктов реакции достаточно высоки[160]. Описано окисление первичной спиртовой группы в тимидилил-(3′→5′)-тимидине под действием перекиси водорода в присутствии дезактивированного платинового катализатора[162].

Обработка дезоксинуклеозидов хромовым ангидридом в пиридине также приводит к производным уроновых кислот[163]. Окисление, по-видимому, частично проходит и по вторичной гидроксильной группе при С-3′, но соответствующие кетоны нестабильны и крайне легко разлагаются с выделением гетероциклического основания. Присутствие оснований в реакционной смеси было обнаружено как при реакции с нуклеозидами, так и при окислении дезоксицитидин-5′-фосфата и тимидин-5′-фосфата.

Единственными продуктами, которые удается идентифицировать после взаимодействия тимидин-5′-фосфата с дициклогексилкарбодиимидом в диметилсульфоксиде[164], являются неорганический фосфат и тимин. Этот результат объясняют окислением 3′-гидроксильной группы под действием диметилсульфоксида[165] и последующим расщеплением 3′-кетотимидин-5′-фосфата

2′-Кетоуридин и 3′-кетоуридин удалось получить при обработке 3′,5′- или 2′,5′-ди-О-тритилуридинов смесями диметилсульфоксид — дициклогексилкарбодиимид, диметилсульфоксид — пятиокись фос-

фора или диметилсульфоксид — уксусный ангидрид с последующим детритилированием [166]:

B—остаток урацила

Эти соединения весьма неустойчивы в слабощелочной среде. Так, 3′-кетоуридин при pH 10,8 практически мгновенно выделяет урацил.

Окисление 2′,3′-O-защищенных производных уридина под действием диметилсульфоксида гладко приводит к соответствующим нуклеозид-5′-альдегидам XVII [164]:

XVII

Продукты окисления первичной спиртовой группы в олигодезоксинуклеотидах достаточно легко претерпевают β-элиминацию с расщеплением фосфодиэфирной связи [160, 162] (см. стр. 66); эта реакция была предложена для определения нуклеотидной последовательности в дезоксиолигонуклеотидах, примыкающей к 3′-концу. Еще легче протекает расщепление в олигодезоксинуклеотидах, содержащих на 5′-конце цепи остаток 3′-кетонуклеозида. В этом случае образование основания и олигонуклеотида, содержащего на одно звено меньше, чем исходный, происходит уже в процессе окисления [167].

2. Окисление *цис*-гликольной группировки в рибопроизводных

цис-Гликольная группировка в рибонуклеозидах и рибонуклеозид-5′-фосфатах легко окисляется под действием солей иодной кислоты [168] с образованием диальдегидов типа XVIII:

XVIII

B—остаток основания

В разбавленных водных растворах при pH, близких к нейтральным, это окисление высокоспецифично для гликольных групп; при трех-пятикратном избытке периодата натрия окисление рибонуклеозидов протекает количественно приблизительно за 30 *мин* при комнатной температуре или за 1 *ч* при 0° С.

Анализ продуктов периодатного окисления широко используется для установления строения олиго- и полисахаридов, а также различных производных моносахаридов. Этот подход был использован, в частности, и при выяснении строения мономерных компонентов нуклеиновых кислот. Таким путем была получена информация о размерах окисного цикла углеводного остатка в нуклеозидах[168, 169], месте связи этого остатка и пуринового основания в нуклеозидах[170], конфигурации у гликозидного центра рибозы[171] и о положении фосфатной группы в нуклеотидах, образующихся при расщеплении РНК[168].

Продукты окисления нуклеозидов — диальдегиды типа XVIII — существуют в водных растворах, по-видимому, в виде гидратов. Хотя для производных нуклеозидов определенных данных по этому поводу не имеется, в ряду простых производных моносахаридов на основании УФ-спектров и полярографии был сделан вывод об отсутствии свободной альдегидной группы в продукте реакции. Тем не менее химические превращения продуктов периодатного окисления удается хорошо объяснить исходя из диальдегидной структуры.

При восстановлении продуктов окисления нуклеозидов действием боргидрида натрия в слабощелочной[169, 172] или нейтральной[173] среде гладко образуются соответствующие триолы XIX; восстановление в слабокислой среде дает альдегидодиолы типа XX[172].

HOCH₂–(O)–B; HOH₂C, CH₂OH — XIX ← HOCH₂–(O)–B; OHC, CHO — XVIII → HOCH₂–(O)–B; OHC, CH₂OH — XX

B—остаток основания

При мягком кислотном гидролизе триолов XIX были получены гетероциклические основания, глицерин и гликолевый альдегид[172].

Диальдегиды XVIII легко взаимодействуют с производными гидразина, обычными реагентами на альдегидные группы, причем структура продуктов реакции зависит от применяемого реагента и экспериментальных условий. Так, реакция с фенилгидразином в слабощелочной среде приводит к бис-фенилгидразону XXI[172], в

то время как с гидразидом изоникотиновой кислоты образуется продукт присоединения одной молекулы реагента, имеющий, видимо, структуру XXII [174]. Аналогичный продукт возникает и при реакции с тиосемикарбазидом [175], но семикарбазид реагирует, по-видимому, аналогично фенилгидразину [176].

Чрезвычайно легко продукты периодатного окисления нуклеозидов взаимодействуют с аминами. При реакции диальдегида, полученного из аденозин-5′-фосфата, с метиламином было выделено соединение XXIII [177].

XXI XXII XXIII

B–остаток основания

Наконец, диальдегиды XVIII могут вступать и в реакции конденсации, приводящие к образованию новой углерод-углеродной связи. Так, описано их взаимодействие с нитрометаном, приводящее к нуклеозидам, производным 3′-нитро-3′-дезоксигексоз [178-180]:

XVIII — 1. CH_3ONa 2. CH_3NO_2 →

B–остаток основания

Весьма характерным свойством продуктов периодатного окисления нуклеозид-5′-фосфатов и их производных является способность к легкому расщеплению в щелочной среде. При этом происходит разрыв фосфомоноэфирной или фосфодиэфирной связи (см. гл. 10) с отщеплением неорганического фосфата или фосфомоно-

эфира, а также разрыв N-глико[illegible] с выделением гетероциклического основания.

```
          O
          ‖
RO—P—O—|—CH2     O       B
         |  |          |
         OH  |  \     /  
              |  \   /   
             OHC      CHO
```

B—остаток основания;
R—атом водорода или различные радикалы

Эффективными катализаторами такого расщепления служат первичные амины; промежуточными продуктами в этом случае являются, очевидно, соединения типа XXIII, которые легко расщепляются при pH < 6. Аналогичный продукт конденсации с гидразидом (XXII) устойчив в интервале pH 4—8 [178].

Фенилгидразоны XXI при обработке избытком фенилгидразина в уксусной кислоте легко расщепляются с выделением гетероциклических оснований [172]. Расщепление N-гликозидной связи в диальдегидах существенно облегчается в присутствии избытка периодата в реакционной смеси [181]; возможно, что это связано с «переокислением» — гидроксилированием промежуточного продукта по C-1′. Подобного рода реакции хорошо известны при периодатном окислении производных углеводов в жестких условиях.

Обработка периодатом олиго- или полирибонуклеотидов приводит к окислению *цис*-гликольной группировки 3′-концевого нуклеозидного звена. Превращение протекает несколько медленнее, чем в случае мономерных нуклеозидов. В интервале pH 5—9 при комнатной температуре реакция полностью специфична. При повышении температуры могут наблюдаться побочные процессы — расщепление звеньев псевдоуридина и гетероциклических ядер других нуклеозидных звеньев (см. гл. 11), однако в обычно используемых условиях (pH 5—9, комнатная температура) протекания этих побочных реакций в сколько-нибудь заметной степени не наблюдается.

Периодатное окисление олиго- и полинуклеотидов широко применяется для анализа и разделения смесей олиго- и полинуклеотидов.

Большое внимание было уделено применению периодатного окисления для выделения индивидуальных тРНК (обзор — см. [182]). Смесь тРНК подвергают ферментативному аминоацилированию и обрабатывают затем периодатом; при этом разрушаются концевые гликольные группировки всех тРНК, не этерифицированные остатком аминокислоты. Продукты их окисления отделяют от аминоацил-тРНК с помощью рассмотренных выше реакций с аминами или гидразидами кислот. Для этой цели предложена адсорбция

тРНК, содержащих концевой остаток диальдегида, на аминоэтилцеллюлозе [183] или взаимодействие [184, 185] их с гидразидом 2-оксинафталин-3-карбоновой кислоты, за которым следует азосочетание продукта реакции с диазотированным *о*-дианизидином и отделение полученного красителя с помощью ионообменной хроматографии *. Наиболее удобным является, по-видимому, использование для адсорбции продуктов окисления гидразида полиакриловой кислоты, заключенного в агаровый гель [186]. С помощью этого метода в сочетании с другими методами фракционирования удалось получить высокоочищенные препараты валиновой тРНК из дрожжей [187–189].

Аналогичный принцип может быть использован для отделения олигонуклеотидов, содержащих 3′-концевую последовательность нуклеотидов с незамещенной *цис*-гликольной группировкой, от других продуктов, образующихся при расщеплении РНК под действием рибонуклеаз [190, 191].

Периодатное окисление РНК с последующей модификацией образующихся диальдегидов под действием меченых реагентов может быть использовано, кроме того, для определения 3′-концевых групп полимера [173–176] (см. стр. 47). Наиболее удобным для этой цели является применение гидразида ^{14}C-изоникотиновой кислоты с высокой удельной активностью [174] или бортритида натрия $NaBT_4$ [173].

Окисление 3′-концевого нуклеозидного звена РНК и последующее расщепление прилегающей к нему фосфодиэфирной связи с выделением гетероциклического основания могут быть использованы для ступенчатого укорачивания цепи олиго- или полинуклеотидов (см. стр. 65). С помощью этого метода для ряда вирусных РНК удалось установить нуклеотидные последовательности, прилегающие к 3′-концу молекулы (см. стр. 81).

Наконец, выполнен ряд исследований по изучению влияния окисления периодатом на функциональные свойства полирибонуклеотидов [175, 176, 192]. В частности, найдено, что фенилаланиловая тРНК из дрожжей после окисления периодатом и последующего восстановления $NaBH_4$ сохраняет способность акцептировать аминокислоты [193].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А., Усов А. И., Чижов О. С., Шибаев В. Н., Химия углеводов, Изд. «Химия», 1967, стр. 132.
2. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966, стр. 12.
3. Garg H. G., J. Sci. Ind Res., 25, 404 (1966).
4. Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1962, 979.

---

* Образование аналогичного красителя положено в основу метода количественного определения тРНК [197].

5. Bredereck H., Martini A., Chem. Ber., **80**, 401 (1947).
6. Andersen W., Hayes D. H., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem Soc., **1954**, 1882.
7. Hayes D. H., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 808.
8. Weygand F., Sigmund W., Chem. Ber., **86**, 160 (1953).
9. Fox J. J., Wempen I., Hampton A., Doerr I. L., J. Am. Chem. Soc. **80**, 1669 (1958).
10. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G., J. Am. Chem Soc., **85**, 3821 (1963).
11. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **101**, 529 (1933).
12. Fox J. J., Van Praag D., Wempen I., Doerr I. L., Cheong L., Knoll J. E., Eidinoff M. L., Bendich A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **81**, 178 (1959).
13. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 816.
14. Beltz R., Visser D. W., J. Am. Chem. Soc., **77**, 736 (1955).
15 Sasaki T., Mizuno Y., Chem. Pharm. Bull., **15**, 894 (1967).
16. Brimacombe R., Kemper W., Yaonini T., Smrt J., Coll. Czech, Chem. Comm., 33, 2074 (1968).
17. Saneyoshi M., Chem. Pharm. Bull., **16**, 1400 (1968).
18. Stuart A., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 2346 (1963); J. Biol. Chem., **239**, 3885 (1964).
19. Lapidot Y., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3852 (1963).
20. Lapidot Y., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3857 (1963).
21. Lohrmann R., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4188 (1964).
22. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B., Tetrahedron, **24**, 639 (1968).
23. Johnston G. A. R., Tetrahedron, **24**, 6987 (1968).
24. Reese C. B., Trentham D. R. Tetrahedron Letters, **1965**, 2467.
25. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B., Sulston J. E., Trentham D. R., Biochemistry, **5**, 3638 (1966).
26. Brown D. M., Fasman G. D., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 1448.
27. Fromageot H. P. M., Griffin B. E., Reese C. B., Sulston J. E., Tetrahedron, **23**, 2315 (1967).
28. Fromageot H. P. M., Reese C. B., Sulston J. E., Tetrahedron, **24**, 3533 (1968).
29. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим., № 5, 118 (1968).
30. Cramer F., Bär H. P., Rhaese H. J., Sänger W., Scheit K. H., Schneider G., Tennigkeit J., Tetrahedron Letters, **1963**, 1039.
31. Žemlička J., Beranek J., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **27**, 2784 (1962).
32. Kresze G., Lodemann E., Wacker A., Z. Naturforsch., **22b**, 285 (1967).
33. Reese C. B., Stewart J. C. M., Tetrahedron Letters, **1968**, 4273.
34. Letsinger R. L., Caruthers M. H., Miller P. S., Ogilvie K. K., J. Am. Chem. Soc., **89**, 7146 (1967).
35. Letsinger R. L., Ogilvie K. K., J. Org. Chem., **32**, 296 (1967).
36. Ogilvie K. K., Letsinger R. L., J. Org. Chem., **32**, 2365 (1967).
37. Windholz T. B., Johnston D. B. R., Tetrahedron Letters, **1967**, 2555.
38. Cook A. F., J. Org. Chem., **33**, 3589 (1968).
39. Hampton A., Nichol A. W, J. Org. Chem., **31**, 3402 (1966).
40. Hampton A., Nichol A. W., Biochemistry, **5**, 2076 (1966).
41. Smrt J., Tetrahedron Letters, **1967**, 3133.
42. Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **33**, 1462 (1968).
43. Кнорре Д. Г., Пустошилова Н. М., Теплова Н. М., Шамовский Г. Г., Биохимия, **30**, 1218 (1965).

44. Кнорре Д. Г., Малышева А. Н., Пустошилова Н. М., Севастьянов А. П., Шамовский Г. Г., Биохимия, **31**, 1181 (1966).
45. Кнорре Д. Г., Шамовский Г. Г., Мол. биол., 2, 37 (1968).
46. Кнорре Д. Г., Пустошилова Н. М., Севастьянов А. П., Биохимия, **33**, 56 (1968).
47. Кнорре Д. Г., Сиротюк В. И., Стефанович Л. Е., Мол. биол., **1**, 837 (1967).
48. Кнорре Д. Г., Пустошилова Н. М., Теплова Н. М., Биохимия, **31**, 666 (1966).
49. Zachau H. G., Feldmann H., Progr. Nucl. Acid Res., **4**, 217 (1965).
50. Wieland T., Jaenicke F., Merz H., Ossorio M., Ann., **613**, 95 (1958).
51. Wieland T., Merz H., Pfleiderer G., Chem. Ber., **93**, 1816 (1960).
52. Zachau H. G., Karau W., Chem. Ber., **93**, 1830 (1960).
53. Дрейман Э. Я., Дмитриева В. А., Камзолова С. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., ЖОХ, 31, 3899 (1961).
54. Соколова Н. И., Баканова В. А., Шабарова З. А., Прокофьева М. А., ЖОХ, **33**, 2408 (1963).
55. Шабарова З. А., Смирнов В. Д., Прокофьев М. А., Биохимия, **29**, 502 (1964).
56. Rammler D. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1997 (1963)
57. Слуцкий О. И., Готтих Б. П., Биохимия, **30**, 1032 (1965).
58. Пурыгин П. П., Краевский А. А., Готтих Б. П., Изв. АН СССР, сер. хим., **1968**, 378.
59. Тарусова Н. Б., Краевский А. А., Пурыгин П. П., Цилевич Т. Л., Готтих Б. П., Изв. АН СССР, сер. хим. (в печати).
60. Готтих Б. П., Краевский А. А., Киселев Л. Л., Фролова Л. Ю., Мол. биол., **1**, 767 (1967).
61. Готтих Б. П., Краевский А. А., Цилевич Т. Л., Рудзите Л. Н., Изв. АН СССР, сер. хим. (в печати).
62. Žemlička J., Chládek S., Coll. Czech. Chem. Comm., **31**, 3775 (1966).
63. Chládek S., Žemlička J., Coll. Czech. Chem. Comm., **32**, 1776 (1967).
64. Chládek S., Žemlička J., Coll. Czech. Chem. Comm., **33**, 232 (1968).
65. Wolfenden R., Biochemistry, **2**, 1090 (1963).
66. Zachau H. G., Chem. Ber., **93**, 1822 (1960).
67. Coles N., Bukenberger M. W., Meister A., Biochemistry, **1**, 317 (1962).
68. Ishida T., Miura K. I., J. Mol. Biol., **11**, 341 (1965).
69. Frank W., Zachau H. G., Z. physiol. Chem., **331**, 258 (1963).
70. Sonnenbichler J., Feldmann H., Zachau H. G., Z. physiol. Chem., 334, 283 (1963); **341**, 249 (1965).
71. Wolfenden R., Rammler D. H., Lipmann F., Biochemistry, 3, 329 (1964).
72. Clark V. M., Hutchinson D. W., Kirby J. A., Warren S. G., Angew. Chem., **76**, 704 (1964).
72a. Браун Д. М., в кн. «Успехи органической химии», т. 3, Изд. «Мир», 1966, стр. 79.
73. Ueda T., Fox J. J., Adv. Carbohydr. Chem., **22**, 307 (1967).
74. Smrt J., Šorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., **28**, 2415 (1963).
75. Smrt J., Šorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., **28**, 2434 (1963).
76. Duffield A. M., Nussbaum A. L., J. Am. Chem. Soc., **86**, 111 (1964).
77. Söll D., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **87**, 350 (1965).
78. Michelson A. M., Biochim. Biophys. Acta, **114**, 460 (1966).
79. Holý A., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **31**, 1528 (1966).
80. Holý A., Pischel H., Coll. Czech. Chem. Comm., **32**, 3719 (1967).
81. Griffin B. E., Reese C. B., Tetrahedron, **24**, 2537 (1968).
82. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **105**, 419 (1934).

83. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. [illegible] 121, 13[illegible]
84. Benz E., Elmore N. F., Good[illegible]
85. Reist E. J., Hart P. A., Goodman L., Baker B. R., J. Org. Chem., 26, 1557 (1961).
86. Horwitz J. P., Chua J., Noell M., Donatti J. T., J. Org. Chem., 32, 817 (1967).
87. Brown D. M., Todd A. R., Varadarajan S., J. Chem. Soc., 1956, 2388.
88. Todd A. R., Ulbricht T. L. V., J. Chem. Soc., 1960, 3275.
89. Codington J. F., Fecher R., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., 82, 2794 (1960).
90. Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1959, 1371.
91. Letsinger R. L., Fontaine J., Mahadevan V., Schexhayder D. A., Leone R. E., J. Org. Chem., 29, 2615 (1964).
92. Grams G. W., Letsinger R. L., J. Org. Chem., 33, 2589 (1968).
93. Ikehara M., Ohtsuka E., Chem. Pharm. Bull., 12, 145 (1964).
94. Юркевич А. М., Колодкина И. И., Преображенский Н. А., ДАН СССР, 164, 828 (1965).
95. Юркевич А. М., Варшавская Л. С., Колодкина И. И., Преображенский Н. А., ЖОХ, 37, 2002 (1967).
96. Юркевич А. М., Колодкина И. И., Евдокимова Г. С., Бажанова Е. Т., Преображенский Н. А., в сб. «Химия органических соединений фосфора», Изд. «Наука», 1967, стр. 215.
97. Колодкина И. И., Варшавская Л. С., Юркевич А. М., Преображенский Н. А., ЖОХ, 37, 1996 (1967).
98. Sasaki Y., Hashizume T., Anal. Biochem., 16, 1 (1966).
99. Hashizume T., Sasaki Y., Anal. Biochem., 15, 199 (1966).
100. Hancock R. L., Goleman D. L., Anal. Biochem., 10, 365 (1965).
101. Hancock R. L., J. Gas. Chrom., 4, 363 (1966).
102. Gehrke C. W., Stalling D. L., Ruyle C. D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 819 (1967).
103. McCloskey J., Lawson A. M., Tsuboyama K., Krueger P. M., Stilwell R. N., J. Am. Chem. Soc., 90, 4182 (1968).
104. Hunt D. F., Hignite C. E., Biemann K., Biochem. Biophys. Res Comm., 33, 378 (1968).
105. Шер В., Шугар Д., Биохимия, 26, 840 (1961).
106. Broom A. D., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 87, 1145 (1965).
107. Khwaja T. A., Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 88, 3640 (1966).
108. Martin D. M. G., Reese C. B., Stephenson G. F., Biochemistry, 7, 1406 (1968).
109. Gin J. B., Dekker C. A., Biochemistry, 7, 1413 (1968).
110. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 94, 809 (1932); 97, 491 (1932); 101, 529 (1933).
111. Brown D. M., Magrath D. J., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1954, 1442.
112. Anderson A. S., Barker G. R., Gulland M. J., Lock M. V., J. Chem. Soc., 1952, 369.
113. Fukuhara Y., Kobayashi K., Kahai Y., Honjo M., Chem. Pharm. Bull., 13, 1273 (1965).
114. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1956, 3459.
115. Griffin B. E., Reese C. B., Stephenson G. F., Trentham D. R., Tetrahedron Letters, 1966, 4349.
116. Reese C. B., Tretham D. R., Tetrahedron Letters, 1965, 2459.
117. Kikugawa K., Sato F., Tsuruo T., Imura N., Ukita T., Chem. Pharm. Bull., 16, 1110 (1968).
118. Imura N., Tsuruo T., Ukita T., Chem. Pharm. Bull., 16, 1105 (1968).
119. Bredereck H., Ber., 66, 198 (1933); Z. physiol. Chem., 223, 61 (1934).
120. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 104, 385 (1934).

121. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 109, 623 (1935).
122. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1953, 951.
123. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1954, 34.
124. Horwitz J. P., Urbanski I. A., Chua J., J. Org. Chem., 27, 3300 (1962).
125. Codington J. F., Doerr I. L., Fox J. J., J. Org. Chem., 29, 588 (1964).
126. Yung N. C., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., 83, 3060 (1961).
127. Žemlička J., Coll. Czech. Chem. Comm., 29, 1734 (1964).
128. Blank H. U., Pfleiderer W., Tetrahedron Letters, 1967, 869.
129. Codington J. F., Fox J. J., Carbohydrate Res., 3, 124 (1966).
130. Smith M., Rammler D. H., Goldberg I. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 84, 430 (1962).
131. Rammler D. H., Lapidot Y., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 1989 (1963).
132. Ohtsuka E., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 89, 2195 (1967).
133. Lohrmann R., Söll D., Hayatsu H., Ohtsuka E., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 88, 819 (1966).
134. Smith M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 81, 2911 (1959).
135. Smrt J., Šorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., 27, 73 (1962).
136. Rammler D. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 84, 3112 (1962).
137. Straus D. B., J. Am. Chem. Soc., 87, 1735 (1965).
138. Женодарова С. М., Седельникова Э. А., Изв. АН СССР, сер. хим. 1964, 1344.
139. Chládek S., Zemlicka J., Šorm F., Coll. Czech. Chem. Comm., 31, 1785 (1966).
140. Reese C. B., Saffhill R., Sulston J. E., J. Am. Chem. Soc., 89, 3366 (1967)
141. Hampton A., J. Am. Chem. Soc., 87, 4654 (1965)
142. Седельникова Э. А., Женодарова С. М., ЖОХ, 38, 2234, 2239 (1968).
143. Cohen L. A., Steele J. A., J. Org. Chem., 31, 2333 (1966).
144. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 106, 113 (1934).
145. Baddiley J., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1947, 648.
146. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1949, 2476.
147. Chambers R. W., Moffatt I. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc 79, 3747 (1957).
148. Chambers R. W., Shapiro R., Kurkov V., J. Am. Chem. Soc., 82 970 (1960).
149. Hampton A., I. Am. Chem. Soc., 83, 3640 (1961).
150. Chládek S., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., 28, 1301 (1963).
151. Hampton A., Fratantori J. C., Carroll P. M., J. Am. Chem. Soc. 87, 5481 (1965).
152. Brown D. M., Haynes L. J., Todd A. R., J. Chem. Soc, 1950, 408, 2399.
153. Cramer F., Sänger W., Scheit K. H., Tennigkeit J., Ann., 679 156 (1964).
154. Gulland J. M., Smith H., J. Chem. Soc., 1947, 338.
155. Gulland J. M., Smith H., J. Chem. Soc., 1948, 527.
156. Bagget N, Foster A. B., Webber J. W., Lipkin D., Phillips B. E. Chem. a. Ind., 1965, 136.
157. Žemlička J., Chládek S., Holý A., Smrt J., Coll. Czech. Chem Comm., 31, 3198 (1966).
158. Eckstein F., Cramer F., Chem. Ber., 98, 995 (1965).
159. Griffin B. E., Jahrman M., Tetrahedron, 23, 2301 (1967).
160. Moss G. P., Reese C. B., Schofield K., Shapiro R. S., Todd A. R. J. Chem. Soc., 1963, 1149.
161. Iwai K., Honjo M., Chem. Pharm. Bull., 13, 7 (1965).
162. Vizsolyi J. P., Tener G. M., Chem. a. Ind., 1962, 263

163. Jones A. S., Williamson A. R., Winkley M., Carbohydrate Res., 1, 187 (1965).
164. Pfitzner K. E., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., 85, 3027 (1963).
165. Pfitzner K. E., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., 87, 5661, 5670 (1965).
166. Cook A. F., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., 89, 2696 (1967).
167. Gabriel T., Chen W. Y., Nussbaum A. L., J. Am. Chem. Soc., 90, 6833 (1968).
168. Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1944, 592.
169. Viscontini M., Hoch D., Karrer P., Helv. Chim. Acta, 38, 642 (1955).
170. Lythgoe B., Smith H., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1947, 355.
171. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1946, 883.
172. Khym J. X., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 82, 6380 (1960).
173. RajBhandary U. L., J. Biol. Chem., 243, 556 (1968).
174. Hunt J. A., Biochem. J., 95, 441 (1965); Midgley J. E. M., Biochim. Biophys. Acta, 108, 340 (1965).
175. Dulbecco R., Smith J. D., Biochim. Biophys. Acta, 39, 358 (1960).
176. Steinschneider A., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, 5, 2729 (1966).
177. Khym J. X., Biochemistry, 2, 344 (1963).
178. Watanabe K. A., Beranek J. Friedman H. A., Fox J. J., J. Org. Chem., 30, 2735 (1965).
179. Beranek J., Friedman H. A., Watanabe K. A., Fox J. J., J. Heterocyclic Chem., 2, 188 (1965).
180. Lichtenthaler F. M., Albrecht H. P., Chem. Ber., 99, 575 (1966).
181. Neu H. C., Heppel L. A., J. Biol. Chem., 239, 2927 (1964).
182. Stephenson M. L., Zamecnik P. C., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Moldave K., Grossman L. (eds), Acad. Press., N. Y. — L., 1967, p. 670.
183. Zubay G., J. Mol. Biol., 4, 347 (1962).
184. Zamecnik P. C., Stephen M. L., Scott J. F., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 46, 811 (1960).
185. Stephenson M. L., Zamecnik P. C., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 47, 1627 (1961).
186. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д., Сандахчиев Л. С., Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим., № 11, 135 (1964).
187. Фролова Л. Ю., Сандахчиев Л. С., Кнорре Д. Г., Киселев Л. Л., ДАН СССР, 158, 235 (1964).
188. Мирзабеков А. Д., Крутилина А. И., Решетов П. Д., Сандахчиев Л. С., Кнорре Д. Г., Хохлов А. С., Баев А. А., ДАН СССР, 160, 1200 (1965).
189. Грачев М. И., Мензорова Н. И., Сандахчиев Л. С., Будовский Э. И., Кнорре Д. Г., Биохимия, 31, 840 (1966).
190. Habermann V., Maidlova E., Cerny R., Coll. Czech. Chem. Comm., 31, 149 (1966).
191. Lee J. S., Gilham P. T., J. Am. Chem. Soc., 88, 5685 (1966).
192. Michelson A. M., Grunberg-Manago M., Biochim. Biophys. Acta, 91, 92 (1964).
193. Cramer F., Haar F., Schlimme E., FEBS Letters, 2, 136 (1968).
194. Sachev H. S., Starkovsky N. A., Tetrahedron Letters, 1969, 733.
195. Griffin B. E., Reese C. B., Tetrahedron, 25, 4057 (1969).
196. Niaz G. R., Reese C. B., Chem. Comm., 1969, 552.
197. Russev G., Anal. Biochem., 27, 244 (1969).

РАСЩЕПЛЕНИЕ ФОСФОЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ РЕАКЦИИ ФОСФАТНЫХ ГРУПП НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

I. ВВЕДЕНИЕ

Реакции, приводящие к расщеплению фосфоэфирных (в особенности фосфодиэфирных) связей, занимают особое место в ряду других химических превращений нуклеиновых кислот и их компонентов. Они являются основой аналитических методов, используемых для определения состава и строения нуклеиновых кислот. Хотя в настоящее время химические методы гидролиза фосфоэфирных связей в значительной степени уступили место ферментативным, позволяющим проводить такое расщепление в более мягких условиях и более специфично, тем не менее возможности химических способов гидролиза еще далеко не исчерпаны.

Расщепление фосфодиэфирных связей, особенно в ряду полирибонуклеотидов, может происходить под действием разнообразных реагентов в широком интервале значений pH (в том числе и близких к нейтральному) и при различных температурах. Поэтому знание границ устойчивости фосфодиэфирных связей при работе с биологически активными нуклеиновыми кислотами и полинуклеотидами особенно важно.

Известны два основных типа реакций, приводящих к расщеплению фосфоэфирных связей. Они могут разрываться в результате расщепления связи Р—О при межмолекулярной или внутримолекулярной нуклеофильной атаке атома фосфора. К этому типу относятся реакции гидролиза фосфомоноэфирных связей в мононуклеотидах и фосфодиэфирных связей в нуклеозидциклофосфатах и полирибонуклеотидах, катализируемые кислотами, щелочами и другими основаниями, а также соединениями тяжелых металлов. Расщепление фосфоэфирных связей может происходить также вследствие разрыва связи С—О в фосфомоно- и фосфодиэфирах, имеющих в углеводном остатке карбонильную группу в β-положении по отношению к фосфоэфирной связи. По такому механизму проходит кислотный гидролиз ДНК, расщепление под действием первичных аминов апуриновых и апиримидиновых ДНК, дезурацильных РНК, а также 3′-концевых нуклеотидных остатков в РНК

после периодатного окисления и аналогичные реакции в ряду производных ДНК.

Помимо перечисленных реакций в этой главе будут рассмотрены также реакции, приводящие к алкилированию фосфатных групп, и некоторые реакции концевых фосфатных групп полинуклеотидов. Реакции пирофосфатов и других нуклеотидангидридов в этой главе не рассматриваются (см. [1]).

II. РЕАКЦИИ С РАЗРЫВОМ СВЯЗЕЙ Р—О

1. Гидролиз фосфомоноэфирных связей в рибонуклеотидах и расщепление РНК до нуклеозидов

Реакции гидролиза фосфомоноэфирных связей, хорошо изученные для разнообразных моноэфиров фосфорной кислоты, в том числе и природных *, в ряду производных нуклеиновых кислот исследованы относительно мало. Это связано прежде всего с тем, что существуют хорошо разработанные методы ферментативного дефосфорилирования мононуклеотидов и концевых нуклеотидных звеньев в олиго- и полинуклеотидах, в то время как химические методы расщепления фосфомоноэфирных связей в рассматриваемых соединениях далеки от совершенства.

Общим методом химического гидролиза рибонуклеозидмонофосфатов до рибонуклеозидов является обработка при pH 4 (обычно в аммонийформиатном буфере) и высокой температуре (100° С и выше) [4, 5]. Такие условия, как было показано для простых алкилфосфатов, являются оптимальными для расщепления фосфомоноэфирных связей [2, 3, 6–8]:

R″OCH$_2$ (O, B; R′O, OR) ⟶ HOCH$_2$ (O, B; HO, OH)

B — остаток основания

R, R′ и R″ — атомы водорода или PO_3H_2

Поскольку оптимум pH реакции гидролиза фосфомоноэфиров совпадает с оптимумом pH существования этих соединений в форме моноаниона, предполагают, что механизм реакции заключается в перераспределении электронов в таком моноанионе (чисто внутримолекулярном или с участием молекулы воды), приводящем в итоге к расщеплению связи Р—О [2, 3, 6]. Роль нуклеофильного реа-

* Обзоры — см. [2, 3].

гента, атакующего атом фосфора, играет недиссоциированная ОН-группа:

R—различные органические радикалы

Изучение гидролиза фосфомоноэфирных связей в ряду фосфорилированных производных аденозина при pH 4 показало, что скорости отщепления фосфатных групп сравнительно мало зависят от положения и числа фосфатных групп в остатке рибозы (табл. 10.1).

Таблица 10.1. **Гидролиз аденозинфосфатов до нуклеозидов в 0,4 M растворе формиата аммония (pH 4, 100 °C, 4 ч)**[4]

Исходное соединение	Степень гидролиза до аденозина, %	Относительная скорость гидролиза в пересчете на одну отщепившуюся фосфатную группу
Аденозин-2′-фосфат	52	1
Аденозин-3′-фосфат	46	0,89
Аденозин-2′,5′-дифосфат	18	0,62
Аденозин-3′,5′-дифосфат	23,5	0,91
Аденозин-2′,3′,5′-трифосфат	21,5	1,2

Природа основания влияет на скорость расщепления фосфомоноэфирной связи, по-видимому, в несколько большей степени (табл. 10.2).

Нагревание мононуклеотидов в водных растворах при низких значениях pH (меньших или равном 1) также приводит к расщеплению фосфомоноэфирных связей[10, 11]. Однако в этих условиях лишь пиримидиновые нуклеотиды расщепляются до нуклеозидов (причем цитидин в значительной степени дезаминируется); для пуриновых нуклеотидов со значительно большей скоростью идет гидролиз N-гликозидных связей (см. гл. 8). Из пуриновых 2′(3′)-

нуклеотидов при этом образуются рибозо-2′(3′)-фосфаты, сравнительно быстро отщепляющие фосфатную группу, вероятно, по механизму β-элиминации (см. стр. 573), а из пуриновых 5′-нуклеотидов — соответственно рибозо-5′-фосфат, гидролизующийся значительно медленнее. С этими факторами, по-видимому, связаны большие различия в скоростях гидролиза фосфомоноэфирных связей: 2′(3′)-мононуклеотиды гидролизуются быстрее, чем 5′-мононуклеотиды, а пуриновые нуклеотиды — быстрее, чем пиримидиновые (табл. 10.3).

Таблица 10.2. **Гидролиз рибонуклеозид-5′-фосфатов до нуклеозидов при кипячении в аммоний-формиатном буфере[5]**

Исходное соединение	pH	Время, *ч*	Выход нуклеозида, %
Аденозин-5′-фосфат	5,0—5,5	40	80
Гуанозин-5′-фосфат	4,0	60	83
Уридин-5′-фосфат	4,0	120	88
Цитидин-5′-фосфат	5,0—5,5	70	54 *

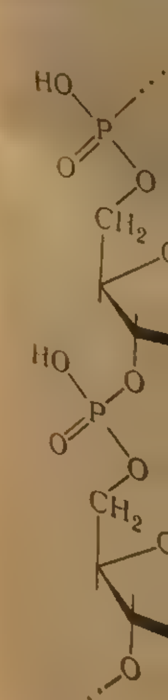
* Низкий выход цитидина связан с его частичным дезаминированием до уридина[9].

Гидролиз фосфоэфирных связей в нуклеозид-2′(3′)-фосфатах протекает также под действием солей и гидроокисей тория[12], циркония[12], редкоземельных элементов[13, 14] и свинца[15]. Например, при нагревании при 100° С в течение 20 *мин* с гидроокисью лантана уридин-2′(3′)- и цитидин-2′(3′)-фосфаты почти количественно превращаются в соответствующие нуклеозиды[13]. Скорость этой реакции очень сильно зависит от температуры. При 65° С и pH 7 полное дефосфорилирование нуклеотидов под действием гидроокисей лантана, церия и лютеция идет более 100 *ч*[14].

Таблица 10.3. **Гидролиз рибонуклеотидов в 0,1 н. HCl при 100°C[10]**

Исходное соединение	Время полупревращения, *мин*	$k_1 \cdot 10^3$, *мин*	Исходное соединение	Время полупревращения, *мин*	$k_1 \cdot 10^3$, *мин*
Уридин-2′(3′)-фосфат	720	0,4	Уридин-5′-фосфат	3590	0,085
Цитидин-2′(3′)-фосфат	600	0,5	Аденозин-5′-фосфат	1050	0,26
Аденозин-2′(3′)-фосфат	60	5,0	Гуанозин-5′-фосфат	1050	0,26
Гуанозин-2′(3′)-фосфат	180	1,6			

В присутствии солей тория и циркония при 37° С нуклеозид-2′(3′)-фосфаты отщепляют неорганический фосфат как в кислой



(pH 3,6), так и в щелочной (pH 8,3) среде[12]. Соли тория оказались в этом отношении значительно активнее солей циркония (табл. 10.4).

Ионы двухвалентного свинца дефосфорилируют рибонуклеозид-2′(3′)-фосфаты за 2—4 *ч* при pH 6 и 100 °С[15].

Катализ реакции гидролиза фосфомоноэфирных связей соединениями тяжелых металлов объясняется, по-видимому, их способностью связываться с фосфатными группами, повышая электрофильность атома фосфора[15]. Для протекания реакции необходимо наличие в остатке сахара гидроксильной группы, соседней с фосфоэфирной связью, поскольку дезоксирибонуклеотиды под действием ионов металла не дефосфорилируются[12]. Принимает ли эта гидроксильная группа участие в связывании ионов металла с фосфатной группой или в какой-либо другой стадии реакции дефосфорилирования, в настоящее время неизвестно.

В молекуле полинуклеотида фосфомоноэфирные связи имеются только в концевых 3′- или 5′-звеньях. Химические реакции, которые позволили бы избирательно удалять концевые фосфатные группы в РНК без расщепления фосфодиэфирных связей, в настоящее время неизвестны, и для этих целей применяются ферментативные методы. Под действием ряда реагентов РНК могут расщепляться с образованием нуклеозидов. Во всех реакциях этого типа первой стадией является расщепление фосфодиэфирных связей с образованием моно- и олигонуклеотидов (см. стр. 553 сл.), за которой следует гидролиз образовавшихся фосфомоноэфирных связей:

В и В′—остатки оснований

Реакция гидролиза РНК до нуклеозидов широко использовалась для изучения нуклеотидного состава РНК[16–19]. Одним из первых методов такого гидролиза[17] было нагревание РНК с растворами аммиака при 175—180 °С. В дальнейшем для повышения выхода нуклеозидов были использованы более мягкие условия гидролиза[18]. Для получения нуклеозидов применялось также длительное (110 *ч*) кипячение растворов РНК в 50%-ном водном пиридине[19]. Все эти реакции сопровождаются значительным дезаминированием цитидина[20].

Таблица 10.4. **Гидролиз нуклеозид-2′(3′)-фосфатов под действием солей тория и циркония (5 · 10⁻² *мМ*) при 37° С за 24 *ч*[12]**

Исходное соединение	Степень отщепления неорганического фосфата, %			
	под действием солей Th^{IV}		под действием солей Zr^{IV}	
	при pH 8,3	при pH 3,6	при pH 8,3	при pH 3,6
Аденозин-2′(3′)-фосфат	79,2	77,4	22,5	13,7
Цитидин-2′(3′)-фосфат	54,9	76,1	11,3	16,1
Гуанозин-2′(3′)-фосфат	34,5	64,5	6,5	8,0
Уридин-2′(3′)-фосфат	40,3	68,6	18,6	17,0

Нуклеозиды образуются при нагревании РНК при 100° С в течение 4 *ч* в безводном этиленгликоле, содержащем 10% пиперидина[20]. Гидролиз протекает, вероятно, по механизму переэтерификации (трансфосфорилирование, см. стр. 555):

$HOCH_2CH_2OH$

B—остаток основания

Жесткий кислотный гидролиз РНК долгое время являлся основным методом получения пиримидиновых рибонуклеозидов[16] (производные пуринов в этих условиях гидролизуются до оснований, см. гл. 8). Для этих целей применяли, например, нагревание РНК с 10%-ной серной кислотой при 130 °С[21] или с 0,1—1 н. соляной

кислотой при 100 °С в течение 24—48 *ч*[18, 22]. В настоящее время кислотный гидролиз РНК до нуклеозидов не применяется, так как при этом происходит значительное дезаминирование цитидина[22].

РНК также может расщепляться до нуклеозидов при pH 4 в условиях, оптимальных для гидролиза фосфомоноэфирных связей. Так, при нагревании РНК в 8 *М* растворе формиата аммония (pH 4, 140 °С, 5 *ч*)[9] или в 50%-ном водном формамиде (130 °С, 10 *ч*)[9, 23], превращающемся в этих условиях в формиат аммония, с высоким выходом образуются аденозин, гуанозин и уридин. Цитидин, однако, в указанных условиях дезаминируется более чем на 50%[9]. Данный метод был предложен для препаративного получения нуклеозидов из РНК[23].

Соли и гидроокиси ряда тяжелых металлов катализируют расщепление РНК до нуклеозидов (см. стр. 568). С наибольшей скоростью эта реакция протекает при кипячении РНК с гидроокисью свинца (pH 8, 3 *ч*)[15] и гидроокисью висмута (pH 4, 4—6 *ч*)[15]. Менее активны гидроокиси редкоземельных металлов La^{III}, Ce^{III}, Lu^{III}[14, 15, 24], а также циркония и тория[12] (см. табл. 10.10).

2. Гидролиз фосфоэфирных связей в рибонуклеозидциклофосфатах

Рибонуклеозид-2′,3′-цилкофосфаты. Рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфаты* являются промежуточными продуктами гидролиза РНК и полирибонуклеотидов под действием рибонуклеаз[27, 28], при химическом гидролизе РНК, катализируемом кислотами и основаниями[28] (стр. 553 сл.) и при изомеризации (взаимопревращении) рибонуклеозид-2′- и рибонуклеозид-3′-фосфатов[29] (см. стр. 563). Фосфодиэфирная связь в рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфатах расщепляется в щелочной и кислой средах. При этом образуется смесь рибонуклеозид-2′- и -3′-фосфатов, если реакция проводится в воде, или соответствующих моноалкилфосфатов, если средой являются безводные спирты:

B—остаток основания; R= H или Alk

* О методах синтеза рибонуклеозидциклофосфатов см.[25, 26].

Скорости этих реакций чрезвычайно велики по сравнению со скоростями аналогичных превращений нециклических фосфодиэфиров, например диалкилфосфатов, гидролиз и сольволиз которых идет в 10^6—10^7 раз медленнее [2, 3]. Эти различия объясняют особенностями строения пятичленных циклофосфатов [2, 3]. Гидролиз рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфатов особенно быстро идет в кислой среде. Исследования кинетики гидролиза этих соединений [30], а также циклофосфатов ряда *цис*-гликолей [2, 3] привели к заключению [2, 3, 30], что расщеплению фосфодиэфирной связи подвергается недиссоциированная и протонированная (вероятно, по одному из кислородов фосфатного цикла) форма циклофосфата *. В такой форме атом фосфора обладает частичным положительным зарядом, повышающим его электрофильность, и способен подвергаться атаке слабыми нуклеофильными реагентами — молекулой воды или спирта; протонирование по атому кислорода облегчает разрыв связи Р—О.

Реакция обратима, хотя обратный процесс идет со значительно меньшей скоростью [30]. На кинетику кислотного гидролиза рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфатов оказывает влияние природа основания ($k_1 = k_0[H^+]^2$, где k_1 — наблюдаемая константа скорости кислотного гидролиза при 30° С) [30]:

Исходное соединение	$[H^+]$, *моль/л*	k_0, *сек*$^{-1}\cdot$*моль*$^{-2}$
Уридин-2′,3′-циклофосфат . .	0,010—0,040	0,28
Цитидин-2′,3′-циклофосфат . .	0,040—0,100	0,17
Аденозин-2′,3′-циклофосфат .	0,050—0,100	0,06

Среди пиримидиновых производных с наибольшей скоростью расщепляется уридин-2′,3′-циклофосфат; пиримидиновые циклофосфаты гидролизуются быстрее, чем производные аденозина.

Причины различий в скоростях гидролиза пуриновых и пиримидиновых циклофосфатов не вполне ясны. В работе [30] рассмотрены две возможные причины этого эффекта — участие в переходном состоянии атома кислорода при С-2 пиримидинового ядра, ускоряющее реакцию, и влияние положительного заряда на N-1

* Этот вывод основан на том, что при рН, большем рK_a циклофосфатной группы, скорость гидролиза изменяется пропорционально квадрату концентрации ионов водорода, а при значениях рН, меньших рK_a циклофосфата (т. е. когда циклофосфатная группа недиссоциирована), — пропорционально первой степени концентрации ионов водорода [30].

в адениновом ядре, замедляющее реакцию за счет эффекта поля. Предпочтение отдается второму фактору.

Продукты кислотного гидролиза нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов — 2′- и 3′-нуклеотиды — образуются в количествах, близких к эквимольному[30], что является следствием почти равновероятного раскрытия циклофосфатов по обоим кислородам остатка рибозы.

Взаимопревращение 2′- и 3′-рибонуклеотидов, хотя и происходит в условиях реакции, но со значительно меньшей (приблизительно на порядок) скоростью[30]. В безводных спиртах в присутствии HCl (1 капля насыщенного раствора HCl в диоксане на 1 *мл* спирта) рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфаты быстро превращаются в смесь моноалкил-2′- и -3′-нуклеозидфосфатов (за 10—20 *мин* при комнатной температуре). Таким методом были получены рибонуклеозид-2′(3′)-метил-, -этил-, -*н*-пропил, -*трет*-бутил-[31], а также -изопропил- и -бензилфосфаты[32].

Кислотный гидролиз применяется для раскрытия концевых 2′,3′-циклофосфатных группировок в олигонуклеотидах, образующихся при расщеплении РНК под действием рибонуклеаз. Для этих целей применяют обычно обработку 0,1 н. соляной кислотой при комнатной температуре в течение 4 *ч*[25, 34] или 4 н. муравьиной кислотой при комнатной температуре в течение 3 *ч*[33].

Щелочной гидролиз рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфатов идет в более жестких условиях и с меньшей скоростью, чем кислотный. Так, для полного гидролиза этих соединений применяют нагревание с 1 н. раствором NaOH при 100 °C в течение 1 *ч*[25]. Скорость реакции пропорциональна концентрации гидроксил-анионов[30]. Предполагаемый механизм превращения включает в качестве определяющей скорость стадии атаку ионом OH^- или каким-либо другим основанием по слабо электрофильному в данных условиях атому фосфора (поскольку одна из гидроксильных групп фосфатной группировки ионизована).

В отличие от кислотного щелочной гидролиз рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфатов полностью необратим. На скорость реакции, как и при кислотном гидролизе, оказывает влияние природа основания (табл. 10.5).

Уридин-2′,3′-циклофосфат расщепляется несколько быстрее цитидинового производного, аденозин-2′,3′-циклофосфат — значительно медленнее[30]. Причина подобного различия пока не ясна. Соотношение изомерных нуклеозид-2′- и -3′-фосфатов, образующихся при щелочном гидролизе нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов, близко к

эквимольному, однако с небольшим преобладанием 3′-изомера (0,5 н. NaOH, 20 *ч* при 37 °C) [84]:

Исходное соединение	Выход 2′-нуклеотида, %	Выход 3′-нуклеотида, %
Цитидин-2′,3′-циклофосфат . .	45	55
Уридин-2′,3′-циклофосфат . . .	40	60
Гуанозин-2′,3′-циклофосфат . .	45	55

Расщепление рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфатов алкоголятами щелочных металлов в спиртовых средах, приводящее к образованию рибонуклеозид-2′(3′)-алкилфосфатов [31, 35], протекает значительно медленнее аналогичной реакции, катализируемой кислотами (см. стр. 549), и сопровождается образованием побочных продуктов [35]. Так, при обработке аденозин-2′,3′-циклофосфата 1 *М* раствором бензилата натрия в бензиловом спирте в течение 17 *ч* при комнатной температуре были получены аденозин-2′(3′)-бензилфосфаты (31%) и аденозин-2′(3′)-монофосфаты (60%) [35]. В аналогичных условиях (0,2 *М* растворы алкоголятов натрия в соответствующих спиртах, 20 *ч* при комнатной температуре) из нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов получены нуклеозид-2′(3′)-метил-, -этил-, -*н*-пропил- и -*трет*-бутилфосфаты [31]. Особенностью реакции является преимущественное образование 3′-алкилфосфатов в случае спиртов с разветвленными алкильными радикалами (*трет*-бутильным, изопропильным) [31]. Возможно это объясняется пространственными затруднениями, возникающими при атаке такими объемистыми нуклеофильными реагентами атома фосфора [36].

Таблица 10.5. **Константы скорости * щелочного гидролиза нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов** [30]

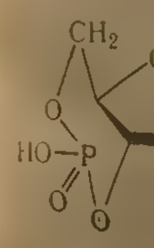
Исходное соединение	Температура, °C	$[OH^-]$, *моль/л*	$k_0 \cdot 10^3$, $сек^{-1} \cdot моль^{-1}$
Уридин-2′,3′-циклофосфат	30	0,025—0,10	5,0
	40	0,025—0,10	8,9
Цитидин-2′,3′-циклофосфат	40	0,010—0,10	6,9
Аденозин-2′,3′-циклофосфат	30	0,05	1,4

* $k_1 = k_0 \cdot [OH^-]$, где k_1 — константа скорости щелочного гидролиза первого порядка.

Для раскрытия концевых циклофосфатных группировок в олиго- и тем более полинуклеотидах щелочной гидролиз неприменим, поскольку в этих условиях с большей скоростью идет гидролиз межнуклеотидных фосфодиэфирных связей (см. стр. 553).

В слабокислой и нейтральной средах (pH 4—7) при температуре 85—100° C уридин- и аденозин-2′,3′-циклофосфаты гидролизуются [30] до соответствующих нуклеозидов *. Стадией, определяю-

* Сообщение о том, что при гидролизе в нейтральной среде уридин-2′,3′-циклофосфат превращается в уридин-3′-фосфат [37] оказалось ошибочным [30].



щей скорость реакции, является гидролиз фосфодиэфирной связи, после чего протекает более быстрый в этих условиях гидролиз фосфомоноэфирной связи (см стр. 542) [30].

Нуклеозид-3′,5′-циклофосфаты. Рибонуклеозид-3′,5′- и дезоксирибонуклеозид-3′,5′-циклофосфаты (об их синтезе см. [38-40]) под действием кислот и оснований претерпевают расщепление фосфодиэфирной связи, которое во многих случаях, в зависимости от условий реакции и природы основания и углеводного остатка, сопровождается гидролизом N-гликозидной связи (стр. 495, 504). Первый из указанных процессов приводит к образованию смеси нуклеозид-3′- и -5′-фосфатов (с преобладанием 3′-изомеров)*, второй — к смеси рибозо- (или дезоксирибозо-)фосфатов, дефосфорилирующихся в более жестких условиях:

В—остаток основания; R=H или OH

Скорость гидролиза фосфодиэфирных связей в нуклеозид-3′,5′-циклофосфатах значительно выше, чем в обычных шестичленных циклофосфатах, например в пропандиол-1,3-циклофосфате [41, 2, 3]

---

* При кислотном гидролизе первоначально образуются нуклеозид-3′-фосфаты, превращающиеся затем в смесь нуклеозид-2′(3′)-фосфатов.

Это связано, по-видимому, с особенностями конформации молекул нуклеозид-3′,5′-циклофосфатов, в которых шестичленная циклофосфатная система находится в *транс*-сочленении с пятичленным рибо-(дезоксирибо-)фуранозным циклом (см. стр 132) [40].

Механизм расщепления фосфодиэфирных связей в нуклеозид-3′,5′-циклофосфатах под действием кислот и оснований, вероятно, аналогичен механизму расщепления этих связей в нуклеозид-2′,3′-циклофосфатах под действием тех же агентов (см. стр. 547). Он может включать атаку нуклеофильным реагентом атома фосфора и разрыв связи Р—О; расщепление связи Р—О при С-5′ происходит с большей скоростью, чем связи Р—О при С-3′ [40], возможно, ввиду их стереохимической неэквивалентности.

Кислотный гидролиз дезоксирибонуклеозид-3′,5′-циклофосфатов [42] и пуриновых рибонуклеозид-3′,5′-циклофосфатов приводит к выделению оснований [40] (см. стр. 495), сопровождающему разрыв фосфодиэфирных связей [40, 43]. Так, при нагревании аденозин-3′,5′-циклофосфата с сульфокатионитом в H^+-форме образуется смесь рибозо-2′-, -3′- и -5′-фосфатов [43]; в более жестких условиях — при нагревании с 1 н. соляной кислотой при 100° — продуктами реакции являются аденин, рибоза и ортофосфорная кислота [40]. При аналогичной обработке (1 н. HCl, 100 °C) уридин-3′,5′-циклофосфат полностью расщепляется за 1 *ч* (время полупревращения 8 *мин*); при этом образуются урацил (67%), уридин-2′(3′)-фосфат (27%) и уридин-5′-фосфат (6%). Цитидин-3′,5′-циклофосфат разрушается полностью за 2 *ч* (время полупревращения 26 *мин*); при этом возникают цитозин (6%), цитидин-2′(3′)-фосфат (78%) и цитидин-5′-фосфат (13%) [40].

Таблица 10.6. **Гидролиз рибонуклеозид-3′, 5′-циклофосфатов в 0,2 н. растворе $Ba(OH)_2$ (100° С, 30 *мин*)** [40]

Исходное соединение	Продукты гидролиза	Выход, %
Уридин-3′,5′-циклофосфат	Уридин-3′-фосфат	81
	Уридин-5′-фосфат	14
Цитидин-3′,5′-циклофосфат	Цитидин-3′-фосфат	41
	Цитидин-5′-фосфат	8
	Уридин-3′-фосфат *	37
	Уридин-5′-фосфат *	7
Аденозин-3′,5′-циклофосфат	Аденозин-3′-фосфат	84
	Аденозин-5′-фосфат	16
Гуанозин-3′,5′-циклофосфат	Гуанозин-3′-фосфат	80
	Гуанозин-5′-фосфат	20

* Образуются за счет дезаминирования производных цитозина.

При щелочном гидролизе нуклеозид-3′,5′-циклофосфатов состав продуктов реакции зависит от применяемого реагента. При нагревании в 1 н. растворе NaOH при 100° С аденозин-3′,5′-циклофосфат отщепляет[40, 43, 44] аденин (см. стр. 504), а уридин-3′,5′-циклофосфат — урацил, хотя основным продуктом реакции является уридин-3′-фосфат (~70%)[40]. В то же время тимидин-3′,5′-циклофосфат в этих условиях количественно превращается в смесь мононуклеотидов (время полупревращения 24 *ч*) — тимидин-3′-фосфат (80%) и тимидин-5′-фосфат (20%)[45]. Значительно более эффективна в качестве гидролизующего агента гидроокись бария, в 0,2—0,4 н. растворах которой при 100° С гидролиз фосфодиэфирных связей в рибонуклеозид-3′,5′-циклофосфатах проходит количественно за 30 *мин* и практически не сопровождается отщеплением оснований[40, 44]. При этом 3′- и 5′-нуклеотиды образуются в соотношении примерно 5 : 1 (табл. 10.6).

Каталитический эффект ионов бария[40] обусловлен, вероятно, их способностью связываться с фосфатной группой.

3. Гидролиз фосфодиэфирных связей в полинуклеотидах

Два типа полинуклеотидов — ДНК и РНК — резко различаются по стабильности фосфодиэфирных связей. В то время как РНК при относительно мягкой щелочной обработке гидролизуется до мононуклеотидов, ДНК в этих условиях довольно устойчива; то же относится к действию соединений тяжелых металлов (см. стр. 568). При кислотном гидролизе происходит деградация полимеров обоих типов, однако характер продуктов и механизм расщепления фосфодиэфирных связей для ДНК и РНК в этом случае различен. Большинство реакций, приводящих к расщеплению фосфодиэфирных связей в РНК, протекает по механизму трансфосфорилирования с участием гидроксильной группы при С-2′ остатка рибозы, в то время как для ДНК характерен распад фосфодиэфирных связей по механизму β-элиминации с предварительным отщеплением оснований (см. стр. 571) или с окислением остатка дезоксирибозы (см. стр. 590).

Реакции такого типа изучены и для РНК (см. стр. 593).

Щелочной гидролиз РНК

Фосфодиэфирные связи в молекуле РНК расщепляются под действием оснований. Если гидролиз идет в водной среде, то конечными продуктами являются нуклеозид-2′(3′)-фосфаты; при обработке алкоголятами щелочных металлов в спиртовых средах

образуются нуклеозид-2′(3′)-алкилфосфаты:

$$\text{нуклеозид-3'-}OP(O)(OH)O\ldots \xrightarrow{RO^-} \text{нуклеозид-3'-}OP(O)(OH)OR + \text{нуклеозид-2'-}OP(O)(OH)OR$$

B–остаток основания; R=H или Alk

Относительная легкость гидролиза фосфодиэфирных связей РНК под действием щелочи, отмеченная еще первыми исследователями[46], представляется необычной, если сравнить ее с устойчивостью тех же связей в ДНК и диалкилфосфатах[2, 3, 47]. Известен, однако, ряд фосфодиэфиров, которые, подобно РНК, легко гидролизуются в щелочной среде. Все они содержат OH-группу в α-положении по отношению к фосфоэфирной связи[2, 3]. Так, 1-метилфосфат глицерина[48], диметилфосфат этиленгликоля[48] и 2′- или 3′- (но не 5′-)бензилфосфаты аденозина[49, 50] быстро гидролизуются в щелочной среде; процесс сопровождается миграцией фосфатной группы:

$$CH_2OP(O)(OH)(OCH_3){-}CHOH{-}CH_2OH \xrightarrow{OH^-} CH_2OPO(OH)_2{-}CHOH{-}CH_2OH + CH_2OH{-}CHOPO(OH)_2{-}CH_2OH$$

Если в α-положении к фосфоэфирной группе находится не гидроксильная, а алкоксигруппа, как, например, в 2-метоксиэтилметилфосфате

$$CH_3OCH_2CH_2O{-}P(=O)(OH){-}OCH_3$$

то такие фосфодиэфиры проявляют обычную устойчивость к щелочному гидролизу[2, 3]. Сходной устойчивостью к щелочному гидролизу обладают и РНК, химически метилированные по гидроксильным группам при C-2′ остатков рибозы[51]. Присутствие в составе ряда РНК 2′-O-метилрибонуклеозидных звеньев (см. стр. 55) приво-

дит к сохранению соответствующих фосфодиэфирных связей в таких РНК в условиях щелочного гидролиза[52]:

$\xrightarrow{OH^-}$ Не гидролизуется

В—остаток основания

Эти данные привели в свое время к предположению*, что в гидролитическом акте участвует ОН-группа при С-2′ остатка рибозы, атакующая атом фосфора, в результате чего происходит разрыв связи Р—О при С-5′ и образуется нуклеозид-2′,3′-циклофосфат, гидролизующийся далее (см. стр. 547) до нуклеозид-2′(3′)-фосфата[50, 56].

Путь А

Путь Б

I Ia

R—остаток рибозы или рибозофосфата

Промежуточное образование нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов доказано[25] выделением их из продуктов щелочного гидролиза РНК (см. стр. 560). Первоначальное предположение о промежуточном образовании циклотриэфиров типа Ia[50] было отвергнуто на

* Впервые оно было высказано в работе[47]. О механизме щелочного и кислотного гидролиза РНК см. в обзорах[38, 53—55].

основании того [57], что при щелочном гидролизе РНК в $H_2^{18}O$ в фосфатную группу образующихся мононуклеотидов включается только один атом ^{18}O.

Каталитическая роль оснований заключается в том, что они вызывают диссоциацию ОН-группы при С-2′ остатков рибозы*, повышая тем самым ее нуклеофильность, после чего внутримолекулярная нуклеофильная атака по атому фосфора может протекать либо по механизму замещения (путь А), либо по механизму присоединения (путь Б). Механизм присоединения был отвергнут, так как образование промежуточного пятиковалентного триэфира I должно было бы приводить к миграции фосфоэфирного остатка в процессе щелочного гидролиза. В действительности это не наблюдается: среди продуктов неполного щелочного гидролиза цитидин-3′-бензилфосфата не обнаружен цитидин-2′-бензилфосфат [58], а среди продуктов неполного гидролиза РНК не обнаружено олигонуклеотидов, содержащих 2′,5′-фосфодиэфирные связи [58].

Изучение кинетики щелочного гидролиза олигонуклеотидов [60–62] и различных РНК [59, 63–70] показало, что скорость расщепления фосфодиэфирной связи, соединяющей два нуклеотидных остатка, зависит от их природы.

Ниже приводятся данные по расщеплению ряда динуклеозидмонофосфатов в 0,5 н. растворе NaOH (28 °С, 8 *ч*) [62]:

Исходный динуклеозидмонофосфат	Степень расщепления фосфодиэфирной связи, %	Исходный динуклеозидмонофосфат	Степень расщепления фосфодиэфирной связи, %
ApA	47	ApC	44
GpA	58	GpC	68
CpA	76	CpC	78
UpA	88	UpC	96

При расщеплении динуклеотидов в 0,86 н. растворе КОН при 26° С были получены следующие результаты [60]:

Исходный динуклеотид	Относительная скорость гидролиза	Исходный динуклеотид	Относительная скорость гидролиза
UpUp	1,0	ApGp	0,21
CpCp	0,62	GpAp	0,18
GpCp	0,25	ApAp	0,10
ApUp	0,25		

Сравнение приведенных данных показывает, что наибольшее влияние на скорость щелочного гидролиза оказывает структура 5′-концевого звена: все динуклеозидфосфаты типа Pud—p—N рас-

* При pH 12 скорость образования нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов при гидролизе РНК возрастает пропорционально концентрации ионов OH^-, а при pH выше 12, когда ОН-группа при С-2′ практически полностью диссоциирована, — не зависит от pH [57].

щепляются значительно медленнее динуклеозидфосфатов типа Pyd—p—N. Гораздо меньше влияет на скорость расщепления фосфодиэфирной связи характер 3′-концевого звена, хотя динуклеозидфосфаты типа Pud—p—Pud гидролизуются заметно медленнее производных типа Pud—p—Pyd.

В олиго- и полинуклеотидах с наименьшей скоростью гидролизуются полипуриновые последовательности, особенно блоки олиго-А, а с наибольшей — полипиримидиновые последовательности, из которых наименее устойчивы[59] блоки олиго-U (табл. 10.7).

Таблица 10.7. **Частичный гидролиз фосфодиэфирных связей в гомополинуклеотидах при pH 10**[59]

Исходный полинуклеотид	Температура гидролиза, °C	Время частичного расщепления фосфодиэфирных связей, *мин*		
		на 1%	на 10%	на 50%
Поли-А	100	2,5	26	150
Поли-U	90	0,7	7	46
Поли-С	100	0,05	5	32

Бóльшая устойчивость полипуриновых блоков проявляется также в том, что при неполном гидролизе РНК образуются преимущественно пуриновые олигонуклеотиды[59]. При гидролизе РНК до мононуклеотидов различия в скоростях гидролиза фосфодиэфирных связей в значительной степени нивелированы, однако и в этом случае проявляется бóльшая устойчивость фосфодиэфирной связи у адениновых звеньев. Так, при гидролизе дрожжевой тРНК в 1 н. растворе КОН при 25 °C время, за которое в виде нуклеозид-2′(3′)-фосфата выделится половина от содержания в РНК данного нуклеотида, составляет[69] 5,6 *ч* для Ap, 2,8 *ч* для Gp; 2,3 *ч* для Cp и 2,6 *ч* для Up.

Природа влияния оснований на скорость гидролиза фосфодиэфирной связи продолжает оставаться предметом обсуждения. Возможно, что одной из основных причин меньшей реакционной способности фосфодиэфирных связей в пуриновых олигонуклеотидах являются межплоскостные взаимодействия, более сильные между пуриновыми основаниями[59, 66] (по сравнению с взаимодействиями между пиримидинами). В частности, для динуклеотидного звена они приводят к такой конформации, при которой атом фосфора удален от ОН-группы при С-2′ остатка рибозы, а вращение связи С-3′—О заторможено. Это затрудняет переход динуклеотидного звена в конформацию, необходимую для достижения переходного состояния реакции гидролиза. Предполагается, что при наличии межплоскостного взаимодействия оснований скорость гидролиза фосфодиэфирной связи примерно в 10 раз меньше, чем при

беспорядочном расположении оснований соседних нуклеотидных остатков[59]. Влияние pH, температуры и ионной силы на относительную реакционную способность фосфодиэфирных связей может быть сопоставлено с влиянием этих факторов на межплоскостные взаимодействия между соответствующими основаниями[59] (см. гл. 4). Так, наибольшие различия в скоростях гидролиза фосфодиэфирных связей наблюдаются[59] при pH 11, когда ионизация остатков гуанина и урацила нарушает межплоскостные взаимодействия, в результате чего полигуаниловые блоки гидролизуются значительно быстрее полиадениловых, а полиуридиловые — быстрее полицитидиловых *.

Еще одним фактором, который может влиять на скорость гидролиза фосфодиэфирных связей РНК, является предполагаемое образование водородных связей между атомом кислорода карбонильной группы при С-2 в пиримидиновых остатках или атомом N-3 в пуриновых остатках и ОН-группой при С-2′ в остатках рибозы (см. стр. 141), что должно приводить к повышению нуклеофильности данной ОН-группы[36, 63]. Согласно этой гипотезе пиримидиновые основания образуют более прочные водородные связи, вследствие чего соответствующие фосфодиэфирные связи более реакционноспособны[36, 63]. Очевидно, что этот фактор может влиять на устойчивость фосфодиэфирных связей только в той области pH (<12), где ОН-группа при С-2′ диссоциирована в незначительной степени.

На устойчивость фосфодиэфирных связей, по-видимому, влияет, кроме того, длина полинуклеотидной цепи[60, 69, 70]. Количественные данные о таком влиянии отсутствуют, однако отмечалось, что скорость гидролиза фосфодиэфирных связей в РНК больше, чем в коротких олигонуклеотидах[66, 70]. Такой же вывод был сделан[69] на основании изучения кинетики образования мононуклеотидов при щелочном гидролизе тРНК.

Это заключение основано на том, что образование мононуклеотидов при щелочном гидролизе тРНК происходит как псевдомономолекулярная реакция. Так как одновременный гидролиз двух соседних фосфодиэфирных связей маловероятен, предполагается, что расщепление тРНК идет в две стадии: быстрый хаотический (случайный) распад на олигонуклеотиды и последующий более медленный ступенчатый гидролиз образовавшихся олигонуклеотидов до мононуклеотидов[69].

Вопрос о влиянии длины полинуклеотидной цепи на скорость гидролиза в настоящее время еще не ясен.

* Следует отметить, что межплоскостные взаимодействия являются, по-видимому, не единственной причиной большей прочности фосфодиэфирных связей в пуриннуклеозидных звеньях, поскольку аналогичные различия в скоростях гидролиза наблюдаются и для фосфодиэфирных связей в нуклеозид-2′,3′-циклофосфатах (см. стр. 548).

Методики щелочного гидролиза РНК до мононуклеотидов весьма разнообразны *. Использовались водные растворы гидроокисей щелочных металлов различной концентрации (0,1—1 н.), гидроокиси бария [73], аммиака [74], пиперидина [75] при температурах от комнатной до 100 °С и выше. Гидролиз водными растворами аммиака, применявшийся в более ранних работах, в настоящее время не используется, так как приводит к образованию значительных количеств нуклеозидов (см. стр. 546). Наибольшее распространение получил метод гидролиза 0,3 н. раствором КОН при 37 °С в течение 16—20 *ч* [76, 77]. Другие методики, применяемые в настоящее время, суммированы ниже [72]:

Реагент	Температура, °С	Время гидролиза *мин*
1 н. КОН	80	60
0,1 н. КОН	100	20
0,05 н. КОН	100	40
10%-ный пиперидин . .	100	90
1%-ный пиперидин . .	100	300

Щелочной гидролиз РНК до мононуклеотидов, хотя он и является одним из самых распространенных методов определения нуклеотидного состава РНК и часто применяется при установлении нуклеотидной последовательности и определении концевых звеньев в олигонуклеотидах (см. стр. 45), как аналитический метод имеет ряд существенных недостатков. В процессе щелочного гидролиза РНК происходит существенное дезаминирование производных цитозина [78] и в еще большей степени 3-N-метилцитозина, разрушение производных 5,6-дигидроурацила (см. стр. 456), а также 7-N-метилпуринов и 1-N-метилгипоксантина (см. стр. 440 и 442), перегруппировка производных 1-N-метиладенина в 6-*экзо*-N-метиладенины (см. стр. 450). Поэтому для анализа содержания этих соединений в составе РНК щелочной гидролиз непригоден.

Гидролиз РНК в щелочной среде может быть остановлен на стадии, когда только часть фосфодиэфирных связей успевает расщепиться, что приводит к образованию набора олигонуклеотидов (табл. 10.8).

В условиях, указанных в табл. 10.8, гидролиз обладает некоторой специфичностью [59], поскольку фосфодиэфирные связи между пиримидиновыми нуклеозидами расщепляются быстрее, чем между пуриновыми нуклеозидами (см. стр. 556).

Гидролиз РНК до олигонуклеотидов (преимущественно динуклеотидов) протекает также при нагревании со слабыми анионитами,

---

* Обзоры — см. [20, 71, 72].

при этом наблюдается частичная изомеризация фосфодиэфирных связей [79].

Под действием некоторых основных реагентов гидролиз РНК может быть задержан на стадии образования нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов. Так, заметные количества циклофосфатов образуются при кипячении РНК в течение 1—4 *ч* с карбонатом бария [25, 28]. Преимущественное образование циклофосфатов наблюдается также при обработке РНК *трет*-бутилатом натрия в формамиде [80]. С высоким выходом (70—80%) циклонуклеотиды были получены нагреванием РНК в течение 3 *ч* в смеси формамида с жидким аммиаком при 100 °С (в ампуле) [81, 82]. Этот метод был предложен для препаративного получения нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов [81, 82].

Таблица 10.8. **Частичный гидролиз РНК в щелочной среде**[59]

pH среды	Температура, °С	Ионная сила буфера	Время частичного расщепления фосфодиэфирных связей, *мин*		
			на 1%	на 10%	на 50%
7,6	90	0,2	420	3 дня	—
9,0	100	0,01	—	17	100
11,0	70	0,2	—	20	120
9,0	70	0,2	30	300	—
13,0 (0,1 н. КОН)	60	—	—	0,8	5
14 (1,0 н. КОН)	27	—	0,7	7	40

Обработка РНК 1 н. раствором метилата натрия в смеси формамида с метанолом [80, 83] приводит к образованию нуклеозид-2′(3)′-метилфосфатов. Поскольку 3′-концевые нуклеотидные звенья не превращаются при этом в метилфосфаты, метанолиз РНК в безводной среде — в 1 н. растворе CH_3ONa при 60 °С в течение 70 *мин*, был предложен как метод определения 3′-концевых нуклеотидов в РНК [80, 84].

В—остаток основания

Щелочной гидролиз тиоацетальных производных апуриновых ДНК

Тиоацетальные производные апуриновых ДНК образуются при действии на ДНК меркаптанов в кислой среде (см. стр. 502). В таких модифицированных ДНК на месте пуриннуклеозидных звеньев находятся ациклические дезоксирибозилтиоацетальные звенья со свободной ОН-группой при С-4′, которая является α-оксигруппой по отношению к обоим фосфатным остаткам (как 3′-, так и 5′-), связывающим такое звено с соседними по цепи.

R=C_2H_5 или CH_2COOH

Обработка тиоацеталей апуриновых ДНК 1 н. раствором NaOH при 37° С в течение 26 *ч* приводит к расщеплению фосфодиэфирных связей у дезоксирибозилацетальных звеньев по механизму с участием ОН-группы при С-4′, аналогичному механизму щелочного расщепления РНК (см. стр. 555), в результате чего образуются полипиримидиновые олигонуклеотиды [85–87]. Однако такой гидролиз модифицированных ДНК идет неоднозначно, поскольку ОН-группа при С-4′ может участвовать в расщеплении связи Р—О как с 5′-конца, так и с 3′-конца фрагмента, а также с обеих сторон сразу [88].

Следствием неоднозначности протекания гидролиза фосфодиэфирных связей является гетерогенность образующихся олигонуклеотидов по концевым группам (как 3′-, так и 5′-), поэтому дан-

ный метод гидролиза ДНК в настоящее время представляет лишь исторический интерес.

$R = C_2H_5$ или CH_2COOH

Кислотный гидролиз РНК и изомеризация фосфодиэфирных связей

В кислой среде РНК расщепляется до смеси нуклеозид-2′(3′)-фосфатов. При достаточно жесткой кислотной обработке наряду с гидролизом фосфодиэфирных связей протекает также расщепление N-гликозидных связей в пуриннуклеотидных звеньях (см. гл. 8). В результате конечными продуктами реакции являются пуриновые основания и пиримидиновые 2′(3′)-мононуклеотиды *:

$\xrightarrow{H^+}$ Pu + Pyd-p

В-остаток основания

* Кислотный гидролиз РНК может сопровождаться также расщеплением фосфомоноэфирных связей в образующихся мононуклеотидах (см. стр. 546)

Особенностью гидролиза фосфодиэфирных связей РНК в кислой среде является то, что одновременно с ним протекает изомеризация фосфодиэфирных связей[88, 89] и, кроме того, изомеризация фосфомоноэфирных связей в 2'- и 3'-мононуклеотидах[49]. Все три реакции протекают по одному и тому же механизму и обусловлены участием ОН-группы при С-2' остатка рибозы в этих процессах. Такой вывод был сделан на основании изучения превращений, которым подвергаются в кислой среде фосфомоно- и фосфодиэфиры, имеющие оксигруппу в α-положении к фосфоэфирной связи[2, 3]. Так, было показано, что под действием кислот происходит миграция фосфатной группы в глицерофосфатах[90-91]. При частичном кислотном гидролизе цитидин-3'-бензилфосфата среди продуктов реакции был обнаружен цитидин-2'-бензилфосфат[58].

$$\begin{matrix} CH_2OPO(OH)_2 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHOPO(OH)_2 \\ | \\ CH_2OH \end{matrix}$$

HOCH$_2$, O, B; HO, O, OH; P; O, OCH$_2$C$_6$H$_5$ $\rightleftharpoons$ HOCH$_2$, O, B; HO, O, OH; P; C$_6$H$_5$CH$_2$O, O

B—остаток цитозина

Механизм кислотного гидролиза РНК * в основных чертах сходен с механизмом расщепления РНК под действием оснований, одновременно с которым он и был предложен[50, 56, 58]. Как расщепление, так и изомеризация фосфодиэфирной связи происходят вследствие нуклеофильной атаки ОН-группы при С-2' (остатки рибозы) по атому фосфора соседней 3'-фосфодиэфирной группировки. Недиссоциированная гидроксильная группа при С-2' является довольно слабым нуклеофильным агентом. Однако в условиях кислотного гидролиза (при pH ~ 1 или ниже) диссоциация межнуклеотидных фосфатных групп в РНК по свободной гидроксильной группе в значительной степени подавлена, так как их рK_a лежат

* Обзоры — см.[36, 55].

в пределах 0,7—1 (см. стр. 189). Это приводит к значительному повышению электрофильности атома фосфора *.

Атака гидроксильной группы при С-2′ по атому фосфора может происходить либо по механизму замещения, либо по механизму присоединения, сходными с теми, которые были уже рассмотрены для щелочного гидролиза фосфодиэфирных связей РНК (см. стр. 555). В случае кислотного гидролиза РНК окончательный выбор между этими двумя направлениями еще не сделан.

В соответствии с механизмом замещения атака по атому фосфора сопровождается расщеплением связи Р—О, причем уходящей группой может быть либо недиссоциированная ОН-группа при атоме фосфора (путь А), либо фосфоэфирная группировка С-5′—О (путь Б):

Путь А приводит к изомеризации фосфодиэфирных связей, а путь Б — к их гидролизу.

Возражением против такого механизма является то, что он предполагает протекание изомеризации через промежуточное образование циклотриэфира II, который не удается обнаружить, хотя соот-

* Скорость кислотного гидролиза фосфодиэфирных связей РНК в интервале рН 1,8—2,4, когда бóльшая часть вторичных фосфатных групп диссоциирована, пропорциональна (в первом приближении) концентрации водородных ионов[92]. Следует ожидать, что при рН < 1 концентрация водородных ионов не должна оказывать существенного влияния на скорость процесса.

ветствующие модельные циклотриэфиры были описаны и оказались достаточно устойчивыми в условиях кислотного гидролиза [93]. Поэтому было высказано предположение, что циклотриэфиры типа II не являются истинными промежуточными продуктами в реакции кислотного гидролиза, а существуют лишь в виде активированного комплекса типа IIа, протонированного по кислороду гидроксильной группы при С-2′ (или С-3′) остатка рибозы [36] (о протонировании этих групп в процессе кислотного гидролиза нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов см. стр. 548).

Согласно механизму присоединения общим промежуточным продуктом реакции изомеризации и реакции гидролиза является пятиковалентный циклотриэфир III.

Однако в соответствии с этим механизмом [36] в условиях кислотного гидролиза должна была бы наблюдаться взаимная изомеризация нуклеозид-2′- и -3′-диалкилфосфатов, что в действительности не было обнаружено [94]:

R—алкильный радикал

Таким образом, оба предполагаемых механизма кислотного гидролиза РНК имеют свои «узкие места», и окончательный выбор между ними в настоящий момент сделать затруднительно.

Кинетика кислотного гидролиза РНК практически не изучена (см., однако [92]). На примере динуклеозидмонофосфатов было показано, что скорость расщепления фосфодиэфирной связи в кислой среде зависит от природы нуклеотидных остатков, соединенных этой связью (т. е. от входящих в их состав оснований) [62, 89]. При этом наблюдаются те же закономерности, что и при щелочном гидролизе (см. стр. 556): с наименьшей скоростью расщепляются фосфодиэфирные связи в динуклеозидмонофосфатах с 5′-концевым пуриновым звеном. Ниже приведены данные, характеризующие сравнительную устойчивость ряда динуклеозидмонофосфатов к действию 0,3 н. HCl (8 *ч* при 45° С) [62]:

Исходный динуклеозидмонофосфат	Степень расщепления фосфодиэфирной связи, %	Исходный динуклеозидмонофосфат	Степень расщепления фосфодиэфирной связи, %
ApA	69	ApC	75
GpA	65	GpC	70
CpA	80	CpC	76
UpA	86	UpC	84

В отличие от реакции, катализируемой основаниями, при кислотном гидролизе наиболее устойчивы фосфоэфирные связи в динуклеозидфосфатах с 5′-концевым гуаниновым звеном [36, 62]. Эта устойчивость падает в ряду G > A > C > U, хотя наблюдаемые различия меньше, чем при щелочном гидролизе [62]. (Возможные причины влияния природы оснований на устойчивость фосфодиэфирных связей в олигонуклеотидах уже рассматривались на стр. 557).

Поскольку изомеризация фосфодиэфирных связей в кислой среде протекает одновременно с их гидролизом и, возможно, через один и тот же промежуточный продукт, зависимость скорости обоих процессов от природы составляющих оснований одинакова, что было показано изучением продуктов неполного кислотного гидролиза ряда динуклеозидмонофосфатов [89].

Методики кислотного гидролиза РНК до мононуклеотидов немногочисленны (см. обзоры [71, 72]). Для этих целей обычно применяют обработку РНК 1 н. соляной кислотой при 37° С в течение 18 *ч* [71]. Реакция протекает вначале как гетерогенная вследствие малой растворимости РНК в кислоте. Хотя этот метод до недавнего времени использовался для аналитических целей значительно реже, чем щелочной гидролиз РНК, он имеет по сравнению с ним ряд преимуществ. Так, гидролиз 1 н. соляной кислотой при 37° С приводит к значительно меньшему дезаминированию производных цитозина, чем при щелочном гидролизе (см. стр. 559). Щелочелабильные основания, такие, как 1-N-метиладенин и другие 1-, 3- и 7-алкилпурины, в этих условиях не претерпевают ни перегруппировок, ни расщепления цикла (см. гл. 7), хотя гликозидные связи в производных 3- и 7-алкилпуринов в этих условиях расщепляются (см. гл. 8). Такое расщепление гликозидных связей, наблюдаемое, хотя

и в значительно меньшей степени и для других пуриновых нуклеотидов (см. гл. 8), несколько ограничивает применимость кислотного гидролиза для аналитических целей.

Кислотный гидролиз РНК до пуриновых оснований и пиримидиновых нуклеотидов, очень широко применявшийся в более ранних исследованиях (особенно до развития современных методов хромотографического анализа, см. обзоры[71, 16]), используется для анализа нуклеотидного состава РНК и в настоящее время. С этой целью РНК нагревают при 100° С с 1 н. соляной кислотой в течение 1 *ч*[95]; реже применяется гидролиз 0,4 н. серной кислотой при 100° С в течение 1 *ч*[96]. Побочными процессами, протекающими в этих условиях, являются: расщепление гликозидной связи в производных дигидроурацила (см. гл. 8), частичное дезаминирование производных цитозина (на 2—4%)[95]; возможна также частичная деградация 1-метиладенина (см. стр. 442).

Гидролиз РНК кислотами может быть прерван на стадии образования олигонуклеотидов[88, 97]. Так, при обработке РНК 6 н. соляной кислотой в течение 3 *мин* из реакционной смеси были выделены, хотя и в небольших количествах, короткие олигонуклеотиды[88]. Частичный гидролиз РНК значительно удобнее проводить при более высоких значениях pH, так как при этом удается контролировать степень расщепления фосфодиэфирных связей (табл. 10.9).

Таблица 10.9. **Частичный гидролиз РНК в кислой среде**[59]

Температура, °С	pH	Время частичного расщепления фосфодиэфирных связей, *мин*		
		на 1%	на 10% *	на 50%
20	1	10	100	600
100	2	—	4	50
100	3	4	40	—

* Изомеризация фосфодиэфирной связи в этих условиях протекает менее чем на 1%.

Изомеризация и гидролиз фосфодиэфирных связей являются нежелательными побочными процессами, которые могут происходить при кислотной обработке РНК или олигонуклеотидов, например при раскрытии концевых 2′, 3′-циклофосфатных группировок в олигонуклеотидах (см. стр. 547). В условиях, обычно применяемых для расщепления 2′,3′-циклофосфатных группировок (0,1 н. соляная кислота при комнатной температуре в течение 4 *ч*), изомеризация фосфодиэфирных связей проходит, по-видимому, лишь в незначительной степени[59], хотя процент расщепления фосфодиэфирных связей при этом довольно велик. Предпочтительнее использовать более кратковременную кислотную обработку.

Незначительная изомеризация фосфодиэфирных связей (1—5%) часто наблюдается при удалении группировок, используемых в олигонуклеотидном синтезе для защиты гидроксильной группы при С-2′ (тетрагидропиранильной, этоксиэтильной). Для этого обычно применяют нагревание защищенных олигонуклеотидов с разбавленными (5—20%-ными) растворами уксусной кислоты[98-100]. Изомеризация фосфодиэфирных связей особенно нежелательна, если синтетические олигонуклеотиды предназначаются для последующих биохимических исследований. Например, олигонуклеотиды, содержащие 2′,5′-фосфодиэфирные связи, неактивны в системе Ниренберга—Лидера[101].

Гидролиз РНК под действием соединений тяжелых металлов

Соли и гидроокиси многих тяжелых металлов, среди которых есть представители всех групп периодической системы элементов (табл. 10.10), катализируют расщепление фосфодиэфирных связей в РНК, причем некоторые из них катализируют также и гидролиз фосфомоноэфирных связей (см. стр. 544). Оба процесса часто протекают с достаточно близкими скоростями, в результате чего продуктами реакции наряду с олиго- и 2′(3′)-мононуклеотидами являются также и нуклеозиды:

$$\cdots Np(Np)_nNp\cdots \longrightarrow (Np)_m + (Np)_kN + Np + Np> + N$$

Гидролиз фосфодиэфирных связей РНК, катализируемый соединениями тяжелых металлов, протекает с максимальной скоростью, как правило, в нейтральной, слабощелочной (реже в слабокислой) средах (табл. 10.10), т. е. в тех условиях, в которых большинство из этих металлов образует с РНК труднорастворимые соли (вернее, комплексы). Образование комплексов металлов с вторичными фосфатными группировками РНК, вероятно, и обусловливает их каталитический эффект[36, 15]. Катионы металлов, подобно протонам, присоединяются к кислороду фосфатной группы и повышают электрофильность атома фосфора, что облегчает атаку последнего ОН-группой при С-2′ остатка рибозы *.

C-5′—O—P(=O)(O⁻)—O-3′ (HO-2′) —(Me^{n+})→ C-5′—O—P(=O)(OMe$^{(n-1)}$)—O-3′ (HO-2′)

---

* Возможно, что ОН-группа при С-2′ принимает также участие в связывании катионов металлов[14].

Участие OH-группы при С-2′ остатка рибозы в этом процессе вытекает из образования наряду с 2′(3′)-мононуклеотидами также и нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов (см. табл. 10.10). Кроме того, ДНК[12, 14] и РНК[51], метилированные химическим путем по гидроксильным группам при С-2′, не претерпевают расщепления фосфодиэфирных связей в присутствии соединений тяжелых металлов.

Условия, используемые для гидролиза РНК под действием соединений тяжелых металлов, сильно варьируют у различных исследователей (см. табл. 10.10). Это затрудняет количественное сравнение эффекта металлов различной природы. Тем не менее имеющиеся данные показывают, что быстрее всего расщепление фосфодиэфирных связей происходит под действием соединений свинца и редкоземельных элементов Ce^{III}, La^{III}, Lu^{III} [14, 15, 24, 103, 104]; несколько менее активны Zn^{II}, Cd^{II}, Bi^{III} [102, 103, 105]. Как было показано, в присутствии соединений свинца[104], лантана[14] и цинка[102] на скорость расщепления заметное влияние оказывает нуклеотидный состав полирибонуклеотида: пуриновые полинуклеотиды гидролизуются значительно медленнее полипиримидиновых производных[36] (как и при щелочном и кислотном гидролизе РНК). В присутствии соединений тех же металлов медленнее расщепляются полинуклеотиды, обладающие более прочной вторичной структурой[104]. Причины этих закономерностей, возможно, те же, что и для щелочного гидролиза РНК (см. стр. 553).

Гидролиз РНК, катализируемый соединениями тяжелых металлов, в настоящее время для препаративных или аналитических целей не применяется, однако возможность расщепления фосфодиэфирных связей в присутствии соединений тяжелых металлов в мягких условиях — при нейтральных pH и невысоких температурах — всегда следует учитывать при работе с РНК[103].

III. РЕАКЦИИ С РАЗРЫВОМ СВЯЗЕЙ С—О

Расщепление фосфоэфирных связей в нуклеиновых кислотах с разрывом связей С—О наблюдается в тех случаях, когда эти связи активированы карбонильной группой в остатке сахара, находящейся по отношению к ним в β-положении. Введение такой карбонильной группы может быть достигнуто либо удалением основания (см. гл. 7 и 8), что приводит к активации 3′-фосфоэфирной связи, либо окислением гидроксильных групп в углеводном остатке (см. гл. 9). В последнем случае могут быть активированы как 3′-, так и 5′-фосфоэфирные связи.

Таблица 10.10. **Гидролиз РНК и полирибонуклеотидов в присутствии соединений тяжелых металлов**

Исходный полирибонуклеотид	Соединение металла	pH среды	Температура, °C	Продолжительность реакции, ч	Степень расщепления фосфодиэфирных связей, %	Продукты реакции	Литература
Поли-A	Cu^{II} ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	5	64	20	90	Моно- и олигонуклеотиды	*102*
Поли-A	Zn^{II} ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	7	64	5	100	Моно- и олигонуклеотиды	*102*
Поли-U		7	64	5	100		
Поли-C		7	64	15	100		
Поли-I		7	64	30	50		
РНК из дрожжей		7	64	15	100		
РНК ВТМ	Zn^{II} (10^{-3} *M*)	6,5	65	0,17	Потеря биологической активности	—	*103*
РНК из дрожжей	$Zn(OH)_2$ (суспензия)	8	100	8	100	Мононуклеотиды	*15, 106*
		7	100	10—15			
	$Zn(CH_3COO)_2$	4	100	24			
РНК из дрожжей	$Cd(OH)_2$ (суспензия)	8	100	8	100	Мононуклеотиды	*15, 106*
		7	100	10—15			
		4	100	24			
РНК из дрожжей	$Al(OH)_3$ (суспензия)	8	100	—	—	Мононуклеотиды и нуклеозидциклофосфаты	*106—108, 15,*
		4	100	—	—		*106—108*
РНК из дрожжей	La^{III} ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	7	37	300 суток	89	Моно- и олигонуклеотиды, нуклеозиды	*24*
[illegible]	$L[illegible]^{III}$ (2 · 1[illegible] *M*)	7	64	1,7—3,4	—	Моно- и олигонуклеотиды	*14*
[illegible]		[illegible]	64	[illegible]	—	Нуклеозиды	*14*
Р[illegible]	[illegible]	7	3[illegible]	3[illegible]	31	[illegible]	*24*
[illegible]	Ce^{III}	7	64	1,7—3,4	—	[illegible] нуклеотиды	*14*
Поли-U	Lu^{III}	7	64	1,7—3,4	—	Моно- и олигонуклеотиды	*14*
РНК из дрожжей	$Ce(OH)_3$, $La(OH)_3$	7—8	100	-	—	Нуклеозиды	*15*
РНК из дрожжей	$Lu(OH)_3$	8	80	60—70	100	Нуклеозиды	*51*
РНК из дрожжей	Th^{IV} ($10^{[illegible]}$ *M*)	[illegible]	37	72	—	Нуклеозиды, моно- и олигонуклеотиды	*12*
РНК из дрожжей	$Sn(OH)_2$, $Fe(OH)_2$	pH 7—8	100	—	—	Нуклеозиды, моно- и олигонуклеотиды	*15*
РНК из дрожжей	$Pb(OH)_2$ (суспензия)	8	100	3	100	Нуклеозиды	*15*
		4	100	-	-	Нуклеозиды и мононуклеотиды	*15*
		7,5—8,5	37	1,7	-	Олигонуклеотиды	*104*
Поли-A	Pb^{II} (10^{-4}—10^{-3})	[illegible]	37	1,7	—	Олигонуклеотиды, мононуклеотиды и нуклеозидциклофосфаты	*104*
[illegible]							
[illegible]							
[illegible]							
[illegible]							
[illegible]							
РНК ВТМ	Pb^{II}	5,8	Комнатная	24	100	Мононуклеотиды	*103*
РНК из дрожжей	$Bi(OH)_3$ (суспензия)	4	100	1,7	-	Моно- и олигонуклеотиды	*102*
		4	100	1—6	100	Нуклеозиды	*105*
РНК ВТМ	Cr^{III}, Mn^{II}, Ni^{II}, Co^{II} (10^{-3} *M*)	6,5	65	0,3—1	Потеря биологической активности	—	*103*
РНК из дрожжей	Mn^{II} ($2 \cdot 10^{[illegible]}$ *M*)	7	64	20	—	Олигонуклеотиды	*102*
	Co^{II} ($2 \cdot 10^{[illegible]}$ *M*)	7	64	20	—	Олигонуклеотиды	*102*
	Ni^{II} ($2 \cdot 10^{[illegible]}$ *M*)	7	64	20	—	Олигонуклеотиды	*102*

Таблица 10.10. **Гидролиз РНК и полирибонуклеотидов в присутствии соединений тяжелых металлов**

Исходный полирибонуклеотид	Соединение металла	pH среды	Температура, °C	Продолжительность реакции, ч	Степень расщепления фосфодиэфирных связей, %	Продукты реакции	Литература
Поли-А	Cu^{II} $(2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	5	64	20	90	Моно- и олигонуклеотиды	*102*
Поли-А	Zn^{II} $(2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	7	64	5	100	Моно- и олигонуклеотиды	*102*
Поли-U		7	64	5	100		
Поли-С		7	64	15	100		
Поли-I		7	64	30	50		
РНК из дрожжей		7	64	15	100		
РНК ВТМ	Zn^{II} $(10^{-3}$ *M*)	6,5	65	0,17	Потеря биологической активности	—	*103*
РНК из дрожжей	$Zn(OH)_2$ (суспензия)	8	100	8	100	Мононуклеотиды	*15, 106*
		7	100	10—15			
	$Zn(CH_3COO)_2$	4	100	24			
РНК из дрожжей	$Cd(OH)_2$ (суспензия)	8	100	8	100	Мононуклеотиды	*15, 106*
		7	100	10—15			
		4	100	24			
РНК из дрожжей	$Al(OH)_3$ (суспензия)	8	100	—	—	Мононуклеотиды и нуклеозидциклофосфаты	*106, 108,*
РНК из дрожжей	La^{III} $(2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	4	100	—	—		*15,* *106—108*
		7	37	300 суток	89	Моно- и олигонуклеотиды, нуклеозиды	*21*
Поли-С Поли-I Поли-А Поли-I	La^{III} $(2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	7	64	1,7—3,4	—	Моно- и олигонуклеотиды	*14*
РНК из дрожжей	Ce^{III}	7	64	100	—	Нуклеозиды	*14*
Поли-U	Ce^{III}	7	37	30 суток	31	Нуклеозиды	*24*
Поли-А		7	64	1,7—3,4	—	Моно- и олигонуклеотиды	*14*
Поли-U	Lu^{III}	7	64	1,7—3,4	—	Моно- и олигонуклеотиды	14
РНК из дрожжей	$Ce(OH)_3$, $La(OH)_3$	7—8	100	—	—	Нуклеозиды	[illegible]
РНК из дрожжей	$La(OH)_3$	8	80	60—70	100	Нуклеозиды	51
РНК из дрожжей	Th^{IV} (10 [illegible] *M*)	8,6	37	72		Нуклеозиды, моно- и [illegible]	12
РНК из [illegible]	[illegible]	[illegible]	100				

Поли-U	Lu^{III}	7	64	1,7–3,4	—	Моно- и олигонуклеотиды	*14*
РНК из дрожжей	$Ce(OH)_3$, $La(OH)_3$	7–8	100	-	—	Нуклеозиды	*15*
РНК из дрожжей	$La(OH)_3$	8	80	60–70	100	Нуклеозиды	*51*
РНК из дрожжей	Th^{IV} (10^{-2} *M*)	8,6	37	72	—	Нуклеозиды, моно- и олигонуклеотиды	*12*
РНК из дрожжей	$Sn(OH)_2$, $Fe(OH)_2$	pH 7–8	100	—	—	Нуклеозиды, моно- и олигонуклеотиды	*15*
РНК из дрожжей	$Pb(OH)_2$ (суспензия)	8	100	3	100	Нуклеозиды	*15*
		4	100	—	—	Нуклеозиды и мононуклеотиды	*15*
		7,5–8,5	37	1,7	—	Олигонуклеотиды	*104*
Поли-A, Поли-U, Поли-I, Поли-C, (Поли-A)·(поли-U), (Поли-I)·(поли-C)	Pb^{II} (10^{-4}–10^{-3})	8	37	1,7	—	Олигонуклеотиды, мононуклеотиды и нуклеозидциклофосфаты	*104*
РНК ВТМ	Pb^{II}	5,8	Комнатная	24	100	Мононуклеотиды	*103*
РНК из дрожжей	$Bi(OH)_3$ (суспензия)	4	100	1,7	—	Моно- и олигонуклеотиды	*102*
		4	100	4–6	100	Нуклеозиды	*105*
РНК ВТМ	Cr^{III}, Mn^{II}, Ni^{II}, Co^{II} (10^{-3} *M*)	6,5	65	0,3–1	Потеря биологической активности	—	*103*
РНК из дрожжей	Mn^{II} ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	7	64	20	—	Олигонуклеотиды	*102*
	Co^{II} ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	7	64	20	—	Олигонуклеотиды	*102*
	Ni^{II} ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*)	7	64	20	—	Олигонуклеотиды	*102*

1. Расщепление фосфоэфирных связей после удаления гетероциклических оснований

Кислотный гидролиз ДНК

Нагревание ДНК с растворами кислот приводит к деградации полинуклеотида с образованием пиримидиновых моно- и олигонуклеотидов, фосфорилированных как по 3′-, так и по 5′-концевым звеньям.

···p p p p ··· $\xrightarrow{H^+}$ ···p p + p ··· + Продукты превращения дезоксирибозы

Py Py CHO Py   Py   Py

Кислотная деградация ДНК (образование «тиминовой кислоты») была одной из первых реакций, открытых для этого класса соединений [109]. Первоначально из продуктов кислотного гидролиза ДНК были выделены лишь дезоксицитидин-3′,5′-дифосфат и тимидин-3′,5′-дифосфат [110–113]. Однако впоследствии методами хроматографического анализа было показано, что продуктами реакции наряду с указанными дифосфатами являются также пиримидиновые олигонуклеотиды, фосфорилированные одновременно по 3′- и 5′-концам $p(Pyd{-}p)_n$ [114–119]. Пиримидиновые 3′- и 5′-мононуклеотиды присутствуют в реакционной смеси в количествах, составляющих менее 1% от содержания остальных пиримидиновых производных [115–116]. Эти данные позволили сделать вывод, что расщепление фосфодиэфирных связей при кислотной деградации ДНК происходит по негликозилированным дезоксирибозильным остаткам, образующимся в результате отщепления пуриновых оснований (см. гл. 8). Такое заключение было подтверждено данными, полученными при изучении кислотной деградации модельных олигонуклеотидов [120, 121]. Так, гидролиз dApdCp и dCpdAp 0,01 н. серной кислотой при 100° С в течение 5 *мин* приводит к образованию соответственно pdCp и dCp [120]. При этом фосфодиэфирные связи у негликозилированного дизоксирибозильного звена расщепляются как по 3′-, так и по 5′-положениям. Было также показано [122], что 3′- и 5′-монобензиловые эфиры пуриновых дезоксинуклеотидов в условиях кислотного гидролиза отщепляют пурин и бензилфосфат, в то время как соответствующие пиримидиновые производные в этих условиях относительно устойчивы.

Механизм расщепления фосфодиэфирных связей при кислотном гидролизе ДНК может быть изображен схемой 3 [53, 123] (показан

один углеводный остаток с пуриновым основанием и две связанные с ним фосфатные группы двух нуклеотидных звеньев).

Схема 3. Кислотный гидролиз ДНК.

В ациклической таутомерной форме дезоксирибозильного звена 3′-фосфоэфирная группа находится в β-положении к карбонильной группе при С-1 и может отщепляться по механизму β-элиминации, хорошо известному для фосфорных эфиров β-оксикарбонильных соединений [125, 126]. Отщепление 5′-фосфатной группы у того же звена может происходить в результате дальнейших превращений дезоксирибозильного остатка либо по механизму, подобному β-элими-

нации (путь А), либо через промежуточное образование соединения IV, имеющего карбонильную группу в α-положении к 5′-фосфодиэфирной связи, по механизму α-элиминации, описанному для α-кетофосфорных эфиров[127] (путь Б). Альтернативный механизм, предполагающий участие ОН-группы при С-4′ дезоксирибозного остатка (механизм трансфосфорилирования, см. стр. 553 и 561), был отвергнут, поскольку он предполагает образование значительных количеств олигонуклеотидов, дефосфорилированных по 3′- или 5′-концевым звеньям, которые не были обнаружены в сколько-нибудь заметных количествах[115, 119].

Обычным методом кислотной деградации ДНК является нагревание ее 2%-ного раствора в 0,2 н. серной кислоте при 100° С в течение 35 *мин*[128]. При данном методе гидролиза эти условия являются оптимальными, так как они позволяют достичь достаточно полного расщепления фосфодиэфирных связей у дезоксирибозильных звеньев, образовавшихся в результате апуринизации ДНК (см. также стр. 500). Бо́льшая продолжительность реакции приводит к частичной апиримидинизации ДНК и расщеплению соответствующих фосфодиэфирных связей, как было показано при изучении кинетики кислотного гидролиза пиримидиновых олигонуклеотидов. При этом остаток цитозина отщепляется с большей скоростью, чем остаток тимина[115]. Так, при длительном нагревании динуклеотида pdTpdC в 0,2 н. серной кислоте при 100° С протекает преимущественное отщепление цитозина и образование тимидин-3′,5′-дифосфата:

$$\text{pdTpdC} \xrightarrow{H^+} \text{pdTp} + \text{Cyt}$$

Другим вариантом кислотного гидролиза ДНК является обработка муравьиной кислотой в присутствии различных ароматических аминов[129], среди которых наиболее эффективным оказался дифениламин[129–134]. Стандартная процедура гидролиза заключается в инкубации ДНК с 2%-ным раствором дифениламина в 66%-ной муравьиной кислоте при 30° С в течение 17 *ч*[134]. Продуктами реакции (так же как и при гидролизе ДНК 0,2 н. серной кислотой) являются пиримидиновые моно- и олигодезоксинуклеотиды с 3′- и 5′-концевыми фосфатными группами $p(dNp)_n$, незначительные количества пиримидиновых 3′- и 5′-мононуклеотидов (менее 1% от общего содержания пиримидинов в ДНК[135]), неорганический фосфат и неидентифицированные продукты превращения дезоксирибозы.

Строение олигонуклеотидов, образующихся при гидролизе ДНК действием муравьиной кислоты в присутствии дифениламина, указывает на то, что реакция протекает по механизму β-элиминации. Роль муравьиной кислоты сводится к апуринизации ДНК[129, 133], а дифениламин, без которого расщепление фосфодиэфирных связей практически не происходит[133], по-видимому, образует с карбонильной группой ациклической формы остатка дезоксирибозы «ен-

амин» V, что облегчает β-элиминирование 3′-фосфатной группы (об использовании аминов в реакциях β-элиминации см. стр. 581).

V

Сравнение двух указанных методов кислотного расщепления ДНК показало, что при гидролизе муравьиной кислотой с дифениламином образуется больше коротких ($n \leqslant 4$) олигонуклеотидов [119, 133]. Эти различия обусловлены неполным расщеплением фосфодиэфирных связей по негликозилированным (апуринизованным) остаткам дезоксирибозы в ДНК при гидролизе 0,2 н. серной кислотой [135]. Так, из продуктов расщепления ДНК серной кислотой были выделены пиримидиновые олигонуклеотиды, содержащие негликозилированные дезоксирибозильные звенья, типа

$$p(dNp)_n\text{—}dr\text{—}p(dNp)_m$$

где dr — остаток дезоксирибозы.

В то же время среди продуктов гидролиза ДНК муравьиной кислотой в присутствии дифениламина такие олигонуклеотиды обнаружены не были [135]. Кроме того, при гидролизе ДНК 0,2 н. серной кислотой побочная реакция — отщепление цитозина — идет в заметно большей степени (5,5% от общего содержания цитозина в ДНК), чем при расщеплении муравьиной кислотой и дифениламином (1,2%) [135]. Таким образом, последний метод является более количественным и специфичным [135].

Оба метода кислотного гидролиза ДНК были использованы для анализа распределения остатков пиримидинов в ДНК [124, 129, 136–140, 224–228]; полученные данные говорят о том, что такое распределение существенно отличается от статистического. Очевидно, что для более тонкого изучения первичной структуры ДНК оба указанных метода непригодны.

Щелочной гидролиз ДНК с частично удаленными основаниями

Более общим методом расщепления фосфодиэфирных связей в ДНК является щелочной гидролиз молекул полинуклеотида, из которых тем или иным способом удалены какие-либо основания. При

шелочном гидролизе такой модифицированной ДНК фосфодиэфирные связи расщепляются у дезоксирибозильных звеньев со свободным гликозидным центром (как и при кислотном гидролизе ДНК):

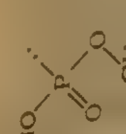
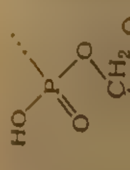
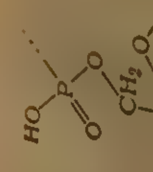
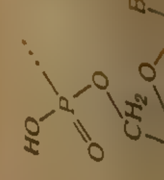
$$\cdots p\,(B)\,p\,(CHO)\,p\,(CHO)\,p\,(B)\cdots \xrightarrow{OH^-} \cdots p\,(B)\,p + p\,(B)\cdots + \mathbf{VI}\ (\text{2-}OPO(OH)_2\text{-циклопентен-2-он})$$

B—остаток основания

Основными продуктами реакции являются [141, 142] нуклеозид-3',5'-дифосфаты и олигонуклеотиды, фосфорилированные по 3'- и 5'-концевым звеньям, неорганический фосфат и 2-оксоциклопентенил-1-фосфат VI *, являющийся продуктом превращения негликозилированных звеньев. В ряде работ было, однако, показано, что в продуктах щелочного гидролиза ДНК с частично удаленными основаниями содержатся значительные количества олигонуклеотидов, лишенных концевых фосфатных групп [143–145]. Эти данные могут быть интерпретированы различным образом с точки зрения двух возможных механизмов щелочного гидролиза ДНК с частично удаленными основаниями: 1) β-элиминации фосфатных групп [53, 146] и 2) их гидролиза по механизму трансфосфорилирования с участием OH-группы при C-4' дезоксирибозильного звена в ациклической форме [147–148]. Роль обоих механизмов в настоящее время продолжает оставаться предметом обсуждения [141–145]. Преимущественное образование олигонуклеотидов, фосфорилированных по 3'- и 5'-концевым звеньям [142], и выделение из продуктов щелочного гидролиза апуриновых ДНК значительных количеств 2-оксоциклопентенил-1-фосфата VI [141, 142] свидетельствуют в пользу того, что расщепление 3'-фосфодиэфирных связей у дезоксирибозильных звеньев со свободным гликозидным центром проходит по механизму β-элиминации (схема 4, см. стр. 577).

Этот механизм аналогичен рассмотренному ранее для кислотного гидролиза ДНК (см. стр. 572). Роль гидроксил-анионов (как и протонов при β-элиминации, катализируемой кислотами) заключается в енолизации карбонильной группы при C-1' в открытой форме остатка дезоксирибозы, приводящей к β-элиминации 3'-фосфатной группы. Отщепление 5'-фосфатной группы может происходить либо по механизму, подобному β-элиминации, либо по механизму α-элиминации (см. также стр. 574). Образование 2-оксоциклопентенил-1-фосфата VI может быть связано с двумя путями превра-

* Это соединение, идентифицированное сравнительно недавно [141–142], в более ранних работах часто обозначалось как «ненуклеотидный органический фосфат».

Неидентифицированные продукты превращения дезоксирибозы

VII

VI

Неидентифицированные продукты превращения дезоксирибозы

B′, B″—остатки оснований

Схема 4. Щелочной гидролиз модифицированной ДНК.

щения промежуточного продукта VII: с отщеплением (путь Б) и без отщепления фосфата (путь А).

В пользу подобного механизма и против участия ОН-группы при С-4′ в расщеплении фосфодиэфирных связей при щелочном гидролизе ДНК с частично удаленными основаниями свидетельствуют также результаты изучения щелочного гидролиза 2′-дезоксирибофуранозил-3′,5′-бис-монобензилфосфата VIII [141]. В продуктах реакции был обнаружен только бензилфосфат (90%), а 3′- и 5′-рибозофосфаты отсутствовали, что однозначно указывает на отщепление бензилфосфата по механизму β-элиминации [141].

$\xrightarrow{OH^-}$ $C_6H_5CH_2OPO(OH)_2$

VIII

Иной результат был получен при изучении гидролиза модельного соединения 5′-фосфодезоксирибозилил-(3′ → 5′)-тимидина IX

13% 87%

IX

В—остаток тимина

в 0,3 н. растворе КОН при 40° С [149]. Основным продуктом реакции в этом случае являлся тимидин, образовавшийся за счет расщепления фосфодиэфирной связи по механизму циклизации с участием ОН-группы при С-4′, а по пути β-элиминации (образование тимидин-5′-фосфата) гидролиз прошел лишь на 13%.

Это заключение может быть, однако, и ошибочным. 5′-Фосфодезоксирибозилил-(3′→5′)-тимидин был получен [149] из 5′-фосфодезоксицитидилил-(3′→5′)-тимидина окислением цитозинового ядра до N-окиси (см. стр. 389) с последующей щелочной и кислотной обработкой, приводящей к расщеплению цикла (см. стр. 455). Прямых доказательств полного расщепления гликозидной связи после такой обработки не приводится.

Если же щелочной деградации подвергалось ациклическое N-гликозидное производное 5′-фосфодезоксирибозилил-(3′→5′)-тимидина, то расщепление фосфодиэфирной связи должно было действительно идти по механизму циклизации гидроксильной группы при С-4′ (см. стр. 561).

Таким образом, возможно, что щелочной гидролиз ДНК с частично удаленными основаниями проходит частью по механизму β-элиминации, а частью по механизму циклизации с участием гидроксильной группы при С-4′.

Щелочной гидролиз был использован для расщепления ряда различных ДНК с частично удаленными тем или иным способом основаниями, например для расщепления апуриновых ДНК [150]. С этой целью апуриновые ДНК обрабатывают 0,2—0,3 н. раствором КОН при 100° С в течение 35—60 *мин* [119] или 0,3—1,0 н. раствором щелочи при 37° С в течение 18—24 *ч* [151]. Основными продуктами реакции, как и при кислотном гидролизе ДНК, являются пиримидиновые нуклеозид-3′,5′-дифосфаты и пиримидиновые олигонуклеотиды, фосфорилированные по 3′- и 5′-концевым звеньям (о других продуктах реакции см. стр. 576). При этом относительное содержание каждого из типов олигонуклеотидов (по длине цепи и нуклеотидному составу) достаточно близко совпадает, если оба метода — гидролиз 0,3 н. щелочью и 0,2 н. серной кислотой при 100° С в течение 35 *мин* — применяются для расщепления одного и того же препарата ДНК [119].

Щелочной гидролиз до недавнего времени являлся единственным методом расщепления ДНК после избирательного удаления из полинуклеотида пиримидиновых оснований действием безводного гидразина (см. стр. 464). Обработке щелочью (0,2—0,3 н. раствор КОН при 100° С, 1 *ч* или 1 — 0,75 н. раствор КОН при 37° С, 18 *ч*) подвергались апиримидиновые ДНК как с дезоксирибозилгидразинными (X) [152—155] (см. стр. 465), так и с негликозилированными дезоксирибозильными (XI) [156—158] (см. стр. 467) звеньями на месте пиримидиновых нуклеозидных звеньев в исходной ДНК:

(x) …p p p … Pu NH(NH_2) Pu

(xi) …p p p … Pu HCO Pu

$\xrightarrow{OH^-}$ …p p Pu + p … Pu

Основными продуктами реакции являются пуриновые нуклеозид-3′,5′-дифосфаты и олигонуклеотиды, фосфорилированные по 3′- и 5′-концевым звеньям. Отмечено также образование дефосфорилированных по концевым звеньям олигонуклеотидов (см. стр. 576) [143, 144]. Кроме того, имеется указание [145] на неполноту и плохую воспроизводимость результатов при щелочном расщеплении апиримидиновых ДНК с дезоксирибозилгидразинными звеньями *. Метод был использован для изучения распределения пуриновых оснований в ДНК [145, 157] (о возможных ограничениях данного метода [159] в связи с неоднозначностью протекания реакции гидразина с дезоксицитидиновыми звеньями ДНК см. стр. 467).

Применимость метода щелочного гидролиза ДНК с частично удаленными основаниями для изучения распределения того или иного типа оснований в ДНК в значительной степени зависит от специфичности реакций, используемых для избирательного разрушения или удаления оснований из состава ДНК, и от строения образующихся дезоксирибозильных звеньев (наличие или отсутствие заместителей у гликозидного атома модифицированного звена). Так, после окисления ДНК перманганатом калия (см. стр. 476), в результате чего разрушаются все основания, кроме аденина, последующий щелочной гидролиз приводит к образованию аденинововых олигонуклеотидов p(dAp)$_n$, главным образом тринуклеозидтетрафосфатов [146]. Дальнейшие исследования показали, однако, что часть образующихся олигонуклеотидов содержит ненуклеотидные дезоксирибозильные производные [160].

Щелочной гидролиз был применен также для расщепления ДНК после ее предварительного дезаминирования с последующим гидроксиламинолизом (удаление остатков цитозина и большей части остатков гуанина, см. стр. 472) [161], а также после предварительного окисления OsO_4 (разрушение остатков тимина и частично остатков

* Это связано, вероятно, с тем, что в дезоксирибозилгидразинных звеньях расщепление фосфодиэфирных связей по механизму β-элиминации затруднено [145].

цитозина, см. стр. 477)[161, 162]. Однако обе эти реакции удаления оснований недостаточно специфичны для использования их в аналитических целях. Кроме того, после удаления оснований указанными методами образуются дезоксирибозильные звенья, связанные с остатками мочевины и азотистых соединений неизвестного строения. Поэтому щелочной гидролиз модифицированных таким путем ДНК приводит к неоднозначным результатам.

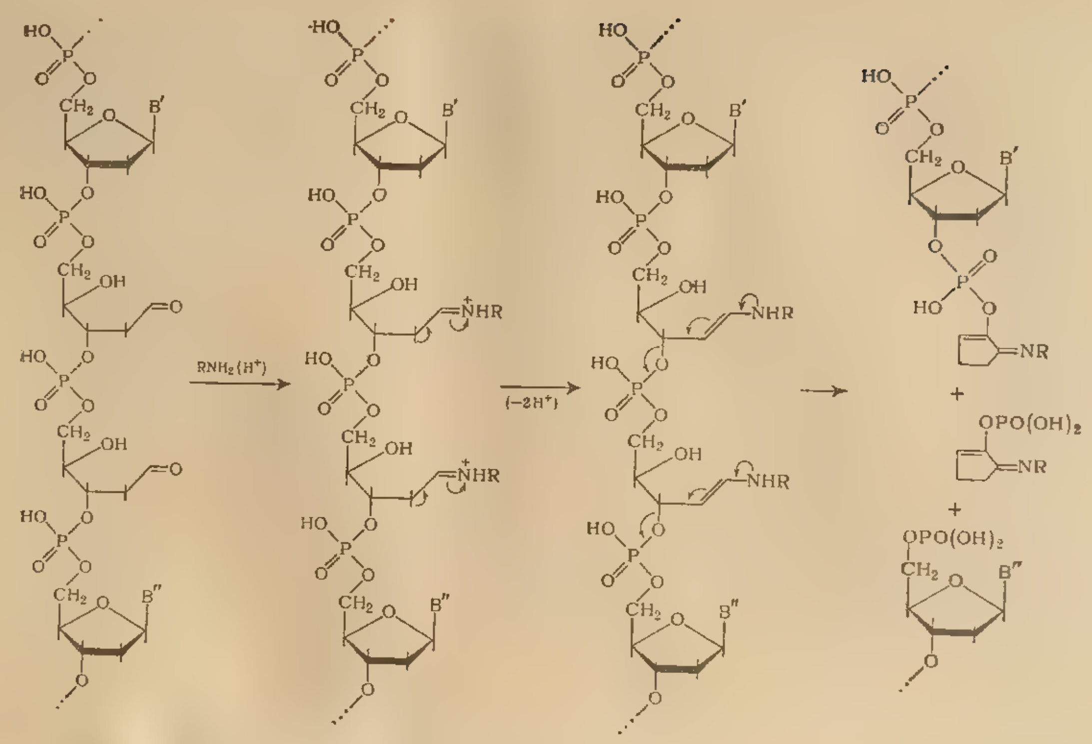
Расщепление ДНК с частично удаленными основаниями под действием аминов

Этот метод расщепления фосфодиэфирных связей в ДНК с частично удаленными основаниями был открыт при попытке получить производные ряда азотистых оснований по карбонильным группам С-1′ дезоксирибозильных звеньев апуриновой ДНК[163].

Было показано, что в присутствии азотистых оснований, таких, как реактив Жирара Т $NH_2NHCOCH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$, семикарбазид $NH_2NHCONH_2$, тиосемикарбазид $NH_2NHCSNH_2$, фенилгидразин $C_6H_5NHNH_2$, 2,4-динитрофенилгидразин $(NO_2)_2C_6H_3NHNH_2$ и анилин $C_6H_5NH_2$, гидролиз фосфордиэфирных связей в апуриновой ДНК протекает при 37° С и pH 2,5—3,5 за 1—8 *ч* (в зависимости от природы азотистого основания). Продуктами реакции являются[163, 164] олигонуклеотиды, фосфорилированные по 5′-концевому звену и несущие на 3′-конце ненуклеотидные остатки (продукты превращения дезоксирибозильного звена, связанные с азотистым основанием), а также «ненуклеотидные органические фосфаты». Строение этих 3′-концевых «ненуклеотидных фрагментов» и «ненуклеотидных органических фосфатов» в настоящее время еще не установлено.

«Ненуклеотидные органические фосфаты», образующиеся в результате реакции ^{14}C-семикарбазида с апуриновой ДНК, идентичны продуктам реакции ^{14}C-семикарбазида с 2′-дезокси-*D*-рибофуранозил-3′,5′-дифосфатом[164] и содержат один атом фосфора на остаток семикарбазида[163, 164]. Обработка апуриновой ДНК производными гидразина (семикарбазидом, фенилгидразином, 2,4-динитрофенилгидразином) приводит к образованию двух типов 3′-концевых «ненуклеотидных звеньев» и двух типов «ненуклеотидных органических фосфатов», причем первичные продукты реакции сильно поглощают в области 300—400 *ммк*[164]. «Ненуклеотидный органический фосфат» (первичный УФ-поглощающий продукт), образующийся в результате реакции апуриновой ДНК с 2,4-динитрофенилгидразином, по данным[164], идентичен 2,4-динитрофенилгидразону 2-оксоциклопентенил-1-фосфата[151]

XII — $OPO(OH)_2$, $=N—R$; $R = NHC_6H_3(NO_2)_2$



B′, B″—остатки оснований

$R = NHCOCH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$; $NHCONH_2$; $NHCSNH_2$; NHC_6H_5; $NHC_6H_3(NO_2)_2$; C_6H_5

Схема 5. Взаимодействие модифицированной ДНК с азотистыми основаниями.

Это позволяет предположить, что 3′-концевые «ненуклеотидные фрагменты» и «ненуклеотидные органические фосфаты» (первичные продукты реакции) являются производными 2-оксоциклопентенил-1-фосфата и азотистых оснований (соединения типа XII).

Взаимодействие модифицированной (апуриновой или апиримидиновой) ДНК с азотистыми основаниями в общем виде можно представить схемой 5 (см. стр. 582).

Реакция протекает, по-видимому, по механизму β-элиминации, на что указывает строение продуктов расщепления апуриновой ДНК [163, 164] и условия проведения реакции, исключающие возможность распада фосфодиэфирных связей по механизму циклизации (в интервале $pH \geqslant 2$ апуриновые ДНК достаточно устойчивы). Роль азотистых оснований заключается в образовании производных по гликозидному атому С-1′ дезоксирибозильного остатка, что облегчает протекание β-элиминации (об аналогичных реакциях в ряду производных РНК см. ниже).

Реакция была использована для расщепления апиримидиновой ДНК. Препараты модифицированной ДНК обрабатывали 3%-ным раствором анилина при pH 5 и 37° С в течение 3 *ч*. Образующиеся олигонуклеотиды, как было показано при включении в них меченного ^{14}C анилина [165], имеют строение $(pN)_np$, где N — остаток пуринового нуклеозида, $n = 1 - 8$. Данный метод гидролиза фосфодиэфирных связей был использован для анализа распределения пуринов (в частности, 6-метиламинопурина) в ДНК [166].

Расщепление ДНК с частично удаленными основаниями под действием различных азотистых оснований является, по-видимому, наиболее перспективным из всех методов подобного типа деградации, существующих в настоящее время; реакция протекает быстро, количественно и в мягких условиях, исключающих побочные реакции.

Расщепление РНК с частично удаленными основаниями

Реакции, приводящие к расщеплению РНК с избирательно удаленными основаниями (о методах получения таких РНК см. гл. 7 и 8), были изучены главным образом на примере дезурацильных РНК, образующихся в результате обработки РНК гидроксиламином при pH 10 (см. стр. 470).

Щелочной гидролиз таких дезурацильных РНК приводит к образованию наряду с нуклеозид-2′(3′)-фосфатами нуклеозид-2′(3′),5′-дифосфатов, получающихся, по-видимому, за счет β-элиминации 3′-фосфоэфирных связей у негликозилированных рибозильных звеньев РНК, так как количество таких нуклеозид-2′(3′),5′-дифосфатов эквивалентно содержанию в РНК уридина [167]. Для избирательного химического гидролиза дезурацильных РНК по

негликозилированным рибозильным звеньям, очевидно, неприменимы методы кислотного и щелочного гидролиза, используемые при расщеплении апуриновых и апиримидиновых ДНК (см. стр. 575 сл.), поскольку при этом происходит гидролиз всех фосфодиэфирных связей РНК. Такой специфический гидролиз модифицированных РНК удается, однако, осуществить в присутствии первичных аминов[168, 169] (см. также стр. 581).

...p–p–p–p... (B, B^u, B', B) —(NH_2OH, pH 10)→ ...p–p–p–p... (B, NH–OH, B', B) —(pH 4)→

→ ...p–p–p–p... (B, HCO, B', B) —(OH^-)→ HO–p (B) + p–p (B') + Продукты деградации рибозы

B, B′–остатки оснований (любые, кроме урацила); B^u–остаток урацила

Первичные жирные амины и аминокислоты (глицин, лизин, β-аланин) в интервале pH 3—8 оказались малоэффективными[269]. Например, в присутствии лизина расщепление дезурацильной тРНК по негликозилированным рибозильным звеньям идет с заметной скоростью лишь в достаточно жестких условиях (pH 8, 80° C), но даже и при этом не достигается полноты расщепления[169]. В то же время ароматические амины (анилин, *п*-анизидин) катализируют эффективное расщепление дезурацильной РНК в слабокислой среде (pH 5) и при невысокой температуре (37° C)[168]. Эффективность различных аминов и влияние pH были изучены на модельной реакции — отщеплении неорганического ортофосфата от рибозил-3′-фосфата[170]:

$HOCH_2$–CH(OH)–CH(O–$PO(OH)_2$)–CH(OH)–CH=O —(RNH_2, pH 3–8)→ H_3PO_4 + Продукты превращения рибозы

R = CH_3; $CH_2CH_2NH_2$; CH_2CH_2COOH; $(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$; C_6H_5; $C_6H_4SO_3H$-*п*; C_6H_4COOH-*п*; C_6H_4COOH-*о*; $C_6H_4OCH_3$-*п*

Среди изученных соединений наиболее эффективным в этой реакции оказался *п*-анизидин при pH 5[170]. В присутствии *п*-анизидина при pH 5 и 37° C дезурацильная рибосомальная РНК полностью расщепляется по негликозилированным рибозильным звеньям за 12 *ч*[168]. В продуктах реакции наряду с олигонуклеотидами был обнаружен «ненуклеотидный органический фосфат» неизвестного строения (XIII), являющийся продуктом превращения дезурацильных рибозильных звеньев[168] (схема 6).

$\xrightarrow{RNH_2}$ … $\rightarrow (HO)_2OPO$ … + Продукты превращения рибозы

$\rightarrow X{-}OPO(OH)_2$ XIII

В—остаток основания; $R = C_6H_5$, $C_6H_4OCH_3$-*п*

Схема 6. Гидролиз модифицированной РНК в присутствии аминов.

Характер концевых звеньев в олигонуклеотидах, образующихся при расщеплении дезурацильной РНК в присутствии ароматических аминов, был выяснен при изучении продуктов превращения в тех же условиях модельных соединений XIV и XV[171].

XIV $\xrightarrow[\text{(pH 3–5)}]{RNH_2}$ (HO)$_2$OPO-нуклеозид + H_3PO_4 + Продукты превращения рибозы

XV $\xrightarrow[\text{(pH 5)}]{RNH_2}$ (HO)$_2$OPOCH$_2$-нуклеозид + Продукты превращения рибозы

B—остаток аденина; R = C_6H_5 или *n*-$CH_3OC_6H_4$

Эти данные показывают, что расщепление дезурацильной РНК в присутствии ароматических аминов приводит к олигонуклеотидам $(pN)_np$[171].

Недавно[172] описано успешное применение метода расщепления в присутствии аминов к фенилаланиновой тРНК из дрожжей, из состава которой было избирательно удалено одно единственное кислотолабильное основание неизвестной природы (см. стр. 503). Инкубация этой модифицированной тРНК в 0,4 *М* растворе лизина при pH 8,5 и 45° С в течение 2 *ч* или в 0,3 *М* растворе анилина при pH 5 и 25° С в течение 5 *ч* приводит к распаду молекулы на две половинки (разрыв вблизи середины цепи)[172]. При этом

не было обнаружено каких-либо побочных реакций, поскольку РНК, состоящая из таких двух половинок, агрегированных за счет водородных связей (см. гл. 4), в значительной степени сохраняет способность акцептировать фенилаланин[172]. Это показывает, что метод химического расщепления РНК с избирательно удаленными основаниями не уступает по своим возможностям ферментативным методам гидролиза фосфодиэфирных связей РНК.

2. Расщепление фосфодиэфирных связей у концевых звеньев полинуклеотидов

Ступенчатая деградация олиго- и полирибонуклеотидов с 3′-конца цепи

Метод ступенчатой деградации полирибонуклеотидной цепи с 3′-конца, впервые описанный в работах[173, 174], включает несколько стадий:

B, B′–остатки оснований; R–органический радикал

Если олиго- или полинуклеотид фосфорилирован по 3′-концу, первой стадией является ферментативное дефосфорилирование. Затем следует периодатное окисление, превращающее 3′-концевой нуклеозидный остаток в 2′,3′-диальдегид XVI, в котором 5′-фосфодиэфирная связь находится в β-положении к 3′-альдегидной группе (подробнее о периодатном окислении см. стр. 531). Завершающей стадией является расщепление 5′-фосфоэфирной связи в диальдегидном производном XVI под действием различных первичных аминов. В результате образуется олиго- или полинуклеотид, «укороченный» с 3′-конца на одно нуклеотидное звено. Весь цикл превращений может быть повторен. От продукта превращения бывшего 3′-концевого нуклеотидного звена XVII при действии кислоты ($pH \leqslant 3$) или щелочи ($pH > 11$) отщепляют основание, определяемое далее обычными аналитическими методами. «Разрешающая способность» метода (возможность определять достаточно длинную 3′-концевую последовательность олигонуклеотида или РНК) зависит от полноты прохождения каждой стадии реакции. Важнейшей из этих стадий является расщепление фосфодиэфирной связи в диальдегиде XVI под действием аминов. Первоначально для этой цели использовали глициновый буфер (pH 10—10,5; 37° C, 18 *ч*)[175, 176]. Таким методом была проведена ступенчатая деградация[173, 177] ряда динуклеотидов

CpGp, ApCp, ApUp, GpCp, GpUp, ApUp

и тринуклеотидов

ApApCp, ApGpCp, GpApCp

В поисках оптимальных условий проведения реакции изучалось влияние ряда аминокислот и первичных аминов (глицина, аспарагина, лизина, метиламина, циклогексиламина)[177–182], pH среды[178–181], температуры[182] на скорость расщепления фосфоэфирной связи в диальдегидах, полученных периодатным окислением рибонуклеозид-5′-фосфатов и ряда олигонуклеотидов со свободной концевой *цис*-гликольной группировкой. Было показано, что расщепление желаемой фосфоэфирной связи наиболее эффективно протекает в присутствии анилина[183], лизина[179–182], циклогексиламина[178, 181, 182] и, в несколько меньшей степени, метиламина[180–182]. Для продуктов периодатного окисления ряда динуклеозидмонофосфатов и олигонуклеотидов было продемонстрировано, что в присутствии лизина, циклогексиламина и метиламина достаточно полное расщепление фосфодиэфирной связи (>95%) происходит только при повышенной температуре (45° C)[182], в то время как при использовании анилина реакция протекает количественно при 24° C[183]. Данные о влиянии pH на скорость распада фосфоэфирной связи противоречивы. Для протекания первой стадии реакции (образования аддукта между окисленным периодатом нуклеотидом и амином, см. стр. 589), по данным[180, 181], оптимальным является

рН > 9. Для второй стадии реакции (собственно расщепления фосфоэфирной связи) необходимо, чтобы рН был меньше 8, с максимальной же скоростью эта стадия протекает при рН, равном 6,5. Для процесса отщепления неорганического фосфата от продукта периодатного окисления аденозин-5′-фосфата было показано, что в присутствии анилина скорость реакции возрастает при понижении рН с 7 до 5[183]. В то же время расщепление фосфодиэфирных связей в олигонуклеотидах, окисленных периодатом, протекает при 45° С в присутствии лизина, метиламина и циклогексиламина одинаково эффективно (за 60—90 *мин*) во всем интервале рН 6—9[182].

При изучении взаимодействия метиламина с окисленным периодатом аденозин-5′-фосфатом[184, 185] было найдено, что первой стадией реакции является образование аддукта между диальдегидом и одной молекулой амина. Этот аддукт имеет, по-видимому, строение производного морфолина XVIII.

$(HO)_2OPOCH_2$ … $\xrightarrow{CH_3NH_2}$ $(HO)_2OPOCH_2$ … HO N OH CH_3 XVIII

B—остаток аденина

При рН > 9 этот аддукт достаточно устойчив, а при рН < 8 происходит отщепление фосфата по механизму β-элиминации:

$PO(OH)_2$ O H_2C O B HO N OH CH_3 XVIII $\underset{-H^+(H_2O)}{\overset{H^+(-H_2O)}{\rightleftarrows}}$ $PO(OH)_2$ O H_2C O B H $\overset{+}{N}$ OH CH_3 $\underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftarrows}}$ $PO(OH)_2$ O H_2C O B N OH CH_3 →

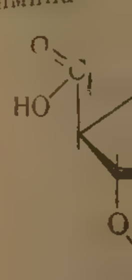
$\longrightarrow H_2PO_4^- +$ H_2C O B $\overset{+}{N}$ OH CH_3 ⟶ BH + Продукты превращения рибозы

B—остаток аденина

Метод ступенчатой деградации с 3′-конца цепи был применен для анализа концевых последовательностей в тРНК [178, 182, 187] и РНК вируса табачной мозаики [183, 186]. С использованием лизина была успешно определена 3′-концевая последовательность-pCpCpA в суммарном препарате тРНК [182, 187]. Расщепление фосфодиэфирных связей в присутствии анилина позволило определить 3′-концевую пентануклеотидную последовательность pGpCpCpCpA в РНК вируса табачной мозаики [186]. В 3′-концевом олигонуклеотиде GpUpUpApCpCpApCpCpCpA, полученном из РНК фага *f*2 с использованием циклогексиламина (pH 8, 45° C, 90 *мин*), удалось определить последовательность шести концевых нуклеотидов [188]. Наиболее длинную 3′-концевую последовательность — 26 нуклеотидных остатков — удалось идентифицировать этим методом * в фенилаланиновой тРНК из *E. coli* (1 *M* раствор лизина, pH 8,0, 45° C, 90 *мин*) [229]. О других методах определения концевых последовательностей в РНК см. стр. 64.

Ступенчатая деградация ДНК

Разработка методов ступенчатой деградации ДНК стала возможной после открытия реакций, позволяющих в мягких условиях превратить гидроксильные группы концевых дезоксирибонуклеотидных остатков ДНК в карбонильные (см. стр. 529).



B–остаток основания

* Присутствие в полинуклеотидной цепи остатка псевдоуридина, окисляющегося периодатом (см. гл. 11) [189, 190], мешает последовательной деградации.

В результате таких превращений фосфодиэфирные связи концевых нуклеотидных звеньев активируются образовавшейся β-карбонильной группой и могут быть расщеплены по механизму β-элиминации. Идея такого метода ступенчатой деградации ДНК впервые была высказана Тоддом [191] и Джонсом [192]. В настоящее время возможность осуществления последовательной деградации ДНК показана, однако, лишь на уровне мононуклеотидов и небольших олигонуклеотидов.

Отщепление 5′-концевых нуклеотидных звеньев было продемонстрировано на продуктах окисления гидроксильной группы при С-5′ до карбоксильной в тимидин-3′-фосфате и динуклеотиде d(TpTp) перекисью водорода [193] или кислородом воздуха [194] в присутствии платинового катализатора. Соединение XIX со свободной карбоксильной группой не претерпевает деградации фосфоэфирных связей в щелочной среде [194]. Однако после превращения карбоксильной группы в амидную (XX) фосфоэфирные связи в окисленном звене количественно расщепляются в 0,25 н. растворе NaOH при 100° С за 40 *мин* [193]. Одновременно наблюдается отщепление тимина [193, 194].

B — остаток тимина; R = H или

Для отщепления 3′-концевых нуклеотидных звеньев от олигодезоксинуклеотидов была использована [195] реакция окисления первичных и вторичных спиртов диметилсульфоксидом в уксусном ангидриде*. Так, дезоксинуклеозид-5′-фосфаты при нагревании в растворах уксусного ангидрида и пиридина в диметилсульфоксиде

* Аналогичное превращение наблюдается при действии на тимидин-5′-фосфат диметилсульфоксида и дициклогексилкарбодиимида [196, 197], однако эта реакция неприменима к олигонуклеотидам [196].

отщепляют 5′-фосфатную группу и основание по схеме[196].

B—остаток основания; R—атом водорода или различные радикалы

Этим методом была проведена ступенчатая деградация олигодезоксирибонуклеотидов, имеющих свободную концевую гидроксильную группу при С-3′ и защищенных или фосфорилированных по гидроксильной группе с 5′-конца[196]:

B^T—остаток тимина, B^C—остаток цитозина,
R—различные защитные группы

Для удаления 3′-фосфатных групп, возникающих после отщепления 3′-концевого нуклеозида, была использована обработка фосфатазой [196].

Применение этого метода к различным тринуклеотидам с защищенной ОН-группой на 5′-конце дало удовлетворительные результаты: на каждой «ступени» деградации в качестве основного продукта было выделено ожидаемое гетероциклическое основание [196].

В настоящее время этот метод еще не может быть использован для деградации ДНК, так как в условиях, используемых для окисления и одновременного расщепления фосфодиэфирных связей в 3′-концевых звеньях, наблюдается заметная апуринизация; кроме того, отщепление оснований из дезоксиолигонуклеотидов протекает неколичественно [196].

3. Некоторые другие реакции нуклеиновых кислот, приводящие к расщеплению фосфодиэфирных связей *

Ряд реакций нуклеиновых кислот сопровождается деградацией полинуклеотидной цепи. В большинстве случаев это связано с отщеплением или разрушением гетероциклических оснований, как, например, при действии на нуклеиновые кислоты гидразина и гидроксиламина (см. стр. 464, 470), обработке их $KMnO_4$ или OsO_4 (см. стр. 476), при фотодинамическом разрушении оснований (см. гл. 12). В других случаях разрушение связано с окислением рибо-

Таблица 10.11. **Расщепление фосфодиэфирных связей в ДНК (из *E. coli*, мол. вес $2 \cdot 10^6$) и РНК (из ВТМ, мол. вес $1 \cdot 10^7$) при инкубации их водных нейтральных растворов (pH 6,9—7,8) при различных температурах [199]**

Значения k_1 рассчитаны по уменьшению среднего молекулярного веса ДНК и РНК по формуле $k_1 = \frac{2,3}{t} \lg \frac{MB_t}{MB_0}$, где t — время, *сек*; MB_0 и MB_t — средний молекулярный вес полинуклеотида в начале инкубации и в момент времени t. Время полупревращения оценивалось по понижению среднего молекулярного веса полинуклеотида

Температура, °C	Расщепление ДНК		Расщепление РНК	
	k_1, *сек*$^{-1}$	время полупревращения	k_1, *сек*$^{-1}$	время полупревращения
5	$1,0 \cdot 10^{-12}$	1160 дней	$5,1 \cdot 10^{-11}$	23 дня
20	$1,0 \cdot 10^{-11}$	116 дней	$3,1 \cdot 10^{-10}$	90 *ч*
37	$1,1 \cdot 10^{-10}$	10 дней	$1,9 \cdot 10^{-9}$	15 *ч*
50	$5,6 \cdot 10^{-10}$	49 *ч*	$5,9 \cdot 10^{-9}$	5 *ч*
75	$9,6 \cdot 10^{-9}$	3 *ч*	$5,0 \cdot 10^{-8}$	33 *мин*
100	$1,1 \cdot 10^{-7}$	15 *мин*	$3,2 \cdot 10^{-7}$	5 *мин*

* Распад нуклеиновых кислот, проходящий под действием физических агентов (например, ультразвука), здесь не рассматривается.

зильных или дезоксирибозильных остатков по С-1′, что также приводит к отщеплению оснований и деградации полинуклеотидной цепи (см. действие разбавленных растворов гидроксиламина и перекиси водорода, стр. 472, 478). Медленный распад фосфодиэфирных связей происходит также при инкубации водных нейтральных растворов нуклеиновых кислот в широком интервале температур (табл. 10.11) [198, 199].

В случае РНК гидролиз в нейтральной среде идет, по-видимому, по обычному механизму с участием ОН-группы при С-2′ остатка рибозы (см. стр. 555). Распад ДНК, вероятно, обусловлен отщеплением пуриновых оснований (см. гл. 8). Действительно, была отмечена деградация апуриновой ДНК (натриевой соли) при нагревании в водных растворах до 100° С, причем происходило отщепление цитозина и образование тиминовых олигонуклеотидов, содержащих, вероятно, 5′-концевые фосфатные группы [200, 201]. Механизм превращения неизвестен.

IV. НЕКОТОРЫЕ РЕАКЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К ОБРАЗОВАНИЮ ФОСФОЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ

1. Алкилирование по фосфатной группе

При действии алкилирующих агентов на нуклеиновые кислоты и их фосфорилированные мономерные компоненты (см. гл. 5) наряду с реакциями по атомам азота гетероциклических оснований может происходить также образование фосфорнокислых эфиров (алкилирование по фосфору):

$$(R'O)(R''O)P(=O)OH + RX \longrightarrow (R'O)(R''O)P(=O)OR$$

$$(R'O)(HO)P(=O)OH + RX \longrightarrow (R'O)(RO)P(=O)OH + (R'O)(RO)P(=O)OR$$

RX — алкилирующий агент

Образование подобных фосфатных эфиров всегда рассматривали как мешающую побочную реакцию, которой старались избежать. Поскольку анализ продуктов реакции алкилирования нуклеиновых кислот очень часто проводится методами, исключающими обнаружение продуктов алкилирования «внутренних» (межнуклеотидных) фосфатных групп, то сведения об алкилировании фосфатных групп полинуклеотидов немногочисленны и часто противоречивы.

Наибольшее число известных примеров алкилирования фосфатной группы относится к реакциям алкилирования мононуклеоти-

дов. При этом, как правило, образуются моноэфиры нуклеотидов, и лишь в отдельных случаях отмечено существование в продуктах реакции следов диалкильных эфиров нуклеотидов. Так, алкилирование нуклеозид-5′-фосфатов в нейтральном водном растворе диазометаном при комнатной температуре приводит к образованию значительных количеств монометиловых эфиров (наряду с метилированием гетероциклических оснований)[202–204]:

B—остаток основания

При 100-кратном (в мольном соотношении) избытке диазометана наблюдается количественное образование монометилового эфира 3-N-метилуридин-5′-фосфата; при 110-кратном избытке реагента в продуктах реакции были обнаружены, кроме того, следы диметилового эфира 3-N-метилуридин-5′-фосфата[203]. При действии на цитидин- и аденозин-5′-фосфаты более чем 100-кратным избытком диазометана происходило образование лишь соответствующих монометиловых эфиров нуклеозид-5′-фосфатов. Диметиловые эфиры нуклеотидов образуются в значительных количествах при алкилировании диазометаном растворов мононуклеотидов в органических растворителях[205].

При алкилировании мононуклеотидов эфирами сульфокислот степень алкилирования фосфатной группировки зависит от pH среды[202, 203, 206]. Так, в нейтральной среде действие диметилсульфата на цитидин-5′-фосфат приводит к образованию значительных количеств (>30%) монометиловых эфиров цитидин- и 3-N-метилцитидин-5′-фосфатов[203]. При более кислых pH, когда фосфатная группа в мононуклеотидах находится в виде моноаниона (что делает ее менее нуклеофильной), степень ее алкилирования снижается; например, обработка аденозин-5′-фосфата диметилсульфатом при pH 4,5 приводит к образованию лишь 5—10% монометилфосфатов[202, 206]. Моноалкилирование по фосфатной группе было показано также в случае реакции уридин-5′-фосфата с окисью этилена при pH 10[207].

Данные относительно алкилирования межнуклеотидных фосфатных групп в соединениях, содержащих фосфодиэфирные связи, весьма противоречивы. Отмечалось[202], что при алкилировании

диазометаном нуклеозид-2′,3′-циклофосфатов и динуклеозидмонофосфатов [202, 204, 208] в водных растворах при pH 7 образования метиловых эфиров по фосфатной группе не наблюдается. Однако при действии диазометана на ряд динуклеозидмонофосфатов (например, UpU, ApU) в водных растворах при pH 8 происходит расщепление фосфодиэфирной связи, возрастающее пропорционально времени реакции и избытку диазометана. Среди продуктов реакции были обнаружены [209] нуклеозид-2′,3′-циклофосфаты и метиловые эфиры нуклеозид-2′(3′)-фосфатов *, возникающие, вероятно, при распаде метиловых эфиров динуклеозидмонофосфатов.

B—остаток урацила

В тех же условиях dTpdT на 14% превращается в метиловый эфир динуклеозидмонофосфата [209].

При действии на динуклеозидмонофосфаты UpA и ApU диметилсульфата при pH 7 алкилирование по фосфатной группе обнаружено не было [202, 204]. Значительное алкилирование по фосфатной группе отмечается при обработке поли-U ипритом $S(CH_2CH_2Cl)_2$ при pH 7,8 [210].

Еще более неопределенным остается вопрос, происходит ли метилирование фосфатных групп в нуклеиновых кислотах (см. [211]). Согласно [212], метилирование водных растворов РНК диазометаном приводит к уменьшению ее молекулярного веса и сильному снижению числа фосфатных групп, способных титроваться протамином. Эти эффекты возрастают с повышением количества диазометана, вводимого в реакцию, и снимаются при добавлении в реакционную среду ионов Mg^{2+} [212]. Они были приписаны метилированию фосфатных групп в РНК, однако непосредственных доказательств такого метилирования не имеется. Было высказано предположение [213], что при алкилировании нуклеиновых кислот реакция алкилирования по фосфатным группам является промежуточной стадией реакции алкилирования по гетероциклическим основаниям. Хотя в дальнейшем это допущение было отвергнуто, возможность существования промежуточных продуктов такого типа вновь обсуждалась недавно [214, 215] в связи с особенностями кинетики алкилирования ДНК β-хлорэтиламинами.

* Необходимо, однако, отметить, что об образовании этих соединений судили, пользуясь косвенными методами [209].

2. Реакции концевых фосфатных групп в полинуклеотидах

Введение метки по концевым фосфатным группам нуклеиновых кислот используется для анализа нуклеотидных последовательностей в концевых участках полинуклеотидов (см. гл. 1).

В настоящее время известно несколько реакций, позволяющих ввести заместители в 3'- и 5'-концевые фосфатные группировки ДНК и в 5'-концевые фосфатные группировки РНК. Первой из них явилось метилирование концевых фосфатов[216]. Метод метилирования основан на том, что триалкиламмониевые соли фосфомоноэфиров под действием дициклогексилкарбодиимида реагируют с метанолом, давая соответствующие диэфиры XXI; триалкиламмониевые соли фосфодиэфиров не вступают в эту реакцию[216, 217].

$$RO{-}P(=O)(OH)O^{-}\ H\overset{+}{N}R'_3 \xrightarrow[C_6H_{11}N=C=NC_6H_{11}]{CH_3OH} RO{-}P(=O)(OCH_3)O^{-}\ H\overset{+}{N}R'_3$$

XXI

С помощью этой реакции были прометилированы 5'-концевые фосфатные группировки в олигонуклеотидах $(pdT)_n[n=1-4]$, pdTpdC, pdTpdA и $(pA)_n$ $[n=1-4]$[216]. Триэтил- или трибутиламмониевые соли олигонуклеотидов под действием карбодиимида в метаноле за 24—48 *ч* при комнатной температуре[216] количественно превращались в монометиловые эфиры:

$(HO)_2OPOCH_2$ … B, R, HO, O, P, O, CH_2, B', HO, R $\xrightarrow[C_6H_{11}N=C=NC_6H_{11}]{CH_3OH}$ OCH_3, O, P, HO, O, CH_2, B, R, HO, P, O, CH_2, B', HO, R

B, B'—остатки оснований; R = H или OH

Впоследствии было обнаружено, что реакция сопровождается метилированием гетероциклических оснований (см. гл. 5)

побочным продуктом реакции — дициклогексилизомочевиной[218]:

$$C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11} + CH_3OH \longrightarrow C_6H_{11}NH{-}\underset{\displaystyle OCH_3}{\underset{|}{C}}{=}NC_6H_{11}$$

Аналогичная реакция была использована для превращения 5′-концевых фосфатных групп в фосфоанилидные. Это было достигнуто обработкой триалкиламмониевых солей олигонуклеотидов $(pA)_3$, $(pU)_4$, а также тРНК диизопропилкарбодиимидом в присутствии анилина в смеси воды, диметилформамида и *трет*-бутилового спирта при pH 8[218, 219]. Реакция идет при комнатной температуре и за 24—48 *ч* протекает на 60—80%[218, 219].

$(HO)_2OPOCH_2$ … B $\xrightarrow[(CH_3)_2CHN=C=NCH(CH_3)_2]{C_6H_5NH_2}$ $C_6H_5NH{-}P(O)(OH){-}O{-}CH_2$ … B

B—остаток основания

Такой метод с использованием ^{14}C-анилина был применен[218, 219] для анализа 5′-концевой последовательности в суммарной тРНК из *E. coli* *. Конденсация ^{14}C-метилфосфоморфолида с три-*н*-гексиламмониевой солью тРНК позволяет превратить 5′-концевой фосфат полинуклеотида в ^{14}C-метилпирофосфат[221]. Реакция проводится при комнатной температуре в пиридине; за 6—7 дней образование пирофосфата протекает на 80%[221].

$(HO)_2OPOCH_2$ … B $\xrightarrow{O(CH_2CH_2)_2N{-}P(O)(OH){-}OCH_3}$ $CH_3O{-}P(O)(OH){-}O{-}P(O)(OH){-}O{-}CH_2$ … B

B—остаток основания

* Аналогично могут быть получены аминокислотные и пептидные производные ряда полинуклеотидов[220].

Метод был применен для анализа 5′-концевой последовательности в суммарной тРНК из *E. coli*[221]. Для тех же целей было использовано превращение 5′-концевого фосфата тРНК в 2,4-динитрофениловый эфир[222].

Описанное недавно цианэтилирование олигонуклеотидов карбодиимидным методом также может найти применение для введения концевой метки[223].

ЛИТЕРАТУРА

1. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966, стр. 187—286.
2. Cox J. R., Ramsay O. B., Chem. Rev., **64**, 317 (1964).
3. Bruice T. C., Benkovic S. J., in «Bioogranic Mechanisms», v. 2, part I, W. A. Benjamin, Inc., New York — Amsterdam, 1966.
4. Baddiley J., Buchanan J. G., Letters R., J. Chem. Soc., **1958**, 1000.
5. Такамн А., Имадзава М., Ириэ М., Укита Т., Якугаку дзасси, J. Pharm. Soc. Japan, **85**, 658 (1965); РЖБиохим., **1966**, 8Ф229.
6. Bunton C. A., Lewellyn D. R., Oldham K. G., Vernon C. A., J. Chem. Soc., **1958**, 3574.
7. Fleury P., C. r., **221**, 4161 (1945).
8. Desjobert A., Bull. Soc. chim. France, **14**, 809 (1947).
9. Hayes D. H., J. Chem. Soc., **1960**, 1184.
10. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 2476
11. Bacher J. E., Allen F. W., J. Biol. Chem., **182**, 701 (1950).
12. Trapmann H., Devani M., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **340**, 81 (1965).
13. Bacher J. E., Allen F. N., J. Biol. Chem., **188**, 59 (1951).
14. Eichhorn G. L., Butzow J. J., Biopolymers, **3**, 79 (1965).
15. Dimroth K., Witzel H., Hülsen W., Mirbach H., Ann., **620**, 94 (1959).
16. Levene P. A., Bass L. W., Nucleic Acids (American Chemical Society Monograph Series), N. Y., 1931.
17. Levene P. A., Jacobs W. A., Ber., **43**, 3150 (1910).
18. Loring H. S., Ordway G., Pierce J. G., J. Biol. Chem., **176**, 1123 (1948).
19. Bredereck H., Martini A., Richter F., Ber., **74**, 694 (1941).
20. Bock R. M., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A. Grossman L., Moldave K. (eds). Academic Press, N. Y. — L., 1967, p. 224.
21. Levene P. A., J. Biol. Chem., **39**, 77 (1919).
22. Loring H. S., Ploeser J. M., J. Biol. Chem., **178**, 439 (1949).
23. Dimroth K., Hamm R., Jaenicke L., Holle K., пат. ФРГ 820328; C. A., **48**, 2091e (1954).
24. Bamann E., Trapmann H., Fischler F., Biochem. Z., **325**, 89 (1954).
25. Markham R., in «Methods in Enzymology», v. 3, Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Academic Press, N. Y. — L., 1957, p. 805.
26. Shugar D., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Academic Press, N. Y. — L., 1967, p. 131.
27. Шапот В. С., Нуклеазы, Изд. «Медицина», 1968.
28. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 552 (1952).
29. Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., **72**, 1471 (1950).
30. Abrash H. I., Cheung C.-C. S., Davis J. C., Biochemistry, **6**, 1298 (1967).
31. Barker G. R., Montagne D. M., Moss R. J., Parsons M. A., J. Chem. Soc., **1957**, 3786.

32. Tener G. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 77, 5349 (1955).
33. Венкстерн Т. В., Ли Л., Крутилина А. И., Аксельрод В. Д., Мирзабеков А. Д., Баев А. А., Мол. биол., **2**, 597 (1968).
34. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 1371.
35. Dekker C. A., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3522 (1954).
36. Witzel H., in «Progress in Nucleic Acid Research», v. 2, Davidson J. N., Cohn W. E. (eds), Academic Press, N. Y. — L., 1963, p. 227.
37. Cheung C.-C. S., Abrash H. I., Biochemistry, **3**, 1883 (1964).
38. Rall T. W., Sutherland E. W., in «Methods in Enzymology», v. 5, Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Academic Press, N. Y.—L., 1962, p. 337.
39. Borden R. K., Smith M., J. Org. Chem., **31**, 3247 (1966).
40. Smith M., Drummond G. I., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **83**, 698 (1961).
41. Khorana H. G., Tener G. M., Wright R. S., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., **79**, 430 (1957).
42. Drummond G. I., Gilgan M. W., Reiner E. J., Smith M., J. Am Chem. Soc., **86**, 1627 (1964).
43. Sutherland E. W., Rall T. W., J. Biol. Chem., **232**, 1077 (1959).
44. Lipkin D., Cook W. H., Markham R., J. Am. Chem. Soc., **81**, 6198 (1959).
45. Turner A. F., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4651 (1959).
46. Thannhauser S. J., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **91**, 329 (1914)
47. Fono A., Arkiv Kemi, Mineral Geol., **24A**, № 33, 14, 15 (1947).
48. Bally O., Gaume J., Bull. Soc. chim. France, **2**, 354 (1935); **3**, 1396 (1936).
49. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 44.
50. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 52.
51. Egami F., Ishimura H., Shimomura M., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **295**, 349 (1953).
52. Lane B. G., Biochemistry, **4**, 212 (1965).
53. Brown D. M., Todd A. R., in «Nycleic Acids», v. 1, Chargaff E., Davidson J. N. (eds), Academic Press, 1955, p. 409.
54. Микельсон А., Химия нуклеотидов и нуклеозидов, Изд. «Мир», 1966, стр. 176—177, 373—375.
55. Brown D. M., in «Comprehensive Biochemistry», v. 8, part 2, Florkin M., Stotz E. H. (eds), Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1963, p. 224—228.
56. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 2040.
57. Lipkin D., Talbert P. T., Cohn M., J. Am. Chem. Soc., **76**, 2871 (1954).
58. Brown D. M., Magrath D. I., Nelson A. H., Todd A. R., Nature, **177**, 1124 (1956).
59. Bock R. M., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A., Grossman L., Moldave K. (eds), Academic Press, N. Y.—L., 1967, p. 218.
60. Lane B. G., Butler G. C., Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 573 (1959).
61. Lane B. G., Allen F. W., Canad. J. Biochem. Physiol., **39**, 721 (1961).
62. Witsel H., Ann., **635**, 185 (1960).
63. Cavalieri H. F., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4899 (1951).
64. Bacher J. E., Kauzman W., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3779 (1952).
65. Hakim A. A., J. Biol. Chem., **225**, 689 (1957).
66. Lane B. G., Butler G. C., Biochim. Biophys. Acta, **39**, 281 (1959).
67. Eigner J., Boedtker H., Michaels G., Biochim. Biophys. Acta, **51**, 165 (1961).
68. Ginoza G., Nature, **181**, 958 (1958).
69. Kaltrieder H. B., Scott J. F., Biochim. Biophys. Acta, **55**, 379 (1962).
70. Michelson A. M., Acta Biochim. Polon., **6**, 335 (1959).
71. Wyatt G. P., in «The Nucleic Acids», v. 1, Davidson J. N., Chargaff E. (eds), Academic Press, N. Y.—L., 1955, p. 243.

72. Loring H. S., in «The Nucleic Acids», v. 1, Davidson J. N., Chargaff E. (eds), Academic Press, N. Y.—L., 1955, p. 137.
73. Loring H. S., Roll P. M., Pierce J. G., J. Biol. Chem., **174**, 729 (1948).
74. Boulanger P., Montreuli J., Bull. Soc. chim. biol., **33**, 784, **791** (1951).
75. Sedat J. W., Hall J. B., J. Mol. Biol., **12**, 174 (1965).
76. Marriann D. H., Smicer V. L., Balis M. E., Brown G. B., J. Biol. Chem., **189**, 533 (1951).
77. Davidson J. N., Smellic R. M. S., Biochem. J., **52**, 594 (1952).
78. Будовский Э. И., Клебанова Л. М., Вопр. мед. хим., **13**, 299 (1967).
79. Dimroth K., Matthalus W., Angew. Chem., **68**, 579 (1956).
80. Lipkin D., Talbert P. T., Chem. a. Ind., **1955**, 143.
81. Tanaka K., J. Biochem. (Tokyo), **47**, 398 (1960).
82. Shionogi A. Co., Ltd., (by Tanaka K.), яп. пат. 4148 (1962); C. A., **61**, 8392d (1964).
83. Lipkin D., Dixon J. S., Science, **116**, 525 (1952).
84. Lipkin D., Dixon J. S., Talbert P. T., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4772 (1961).
85. Jones A. S., Letham D. S., Stacey M., J. Chem. Soc., **1956**, 2579.
86. Jones A. S., Letham D. S., Stacey M., J. Chem. Soc., **1956**, 2584.
87. Jones A. S., Stacey M., Watson B. E., J. Chem. Soc., **1957**, 2454.
88. Merrifield R. B., Wooley D. W., J. Biol. Chem., **197**, 521 (1952).
89. Witzel H., Ann., **620**, 122 (1959).
90. Bailly M. C., C. r., **208**, 442 (1939).
91. Chargaff E., J. Biol. Chem., **145**, 455 (1942).
92. Pollman W., Schramm W., Z. Naturforsch., **16b**, 673 (1961).
93. Szer W., Schugar D., Acta Biochim. Polon., **9**, 131 (1962).
94. Brown D. M., Margrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 4396.
95. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **49**, 401 (1951).
96. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **176**, 715 (1948).
97. Cohn W. E., Markham R., Biochem. J., **62**, 17P (1956).
98. Smith M., Rammley H. G., Goldberg I. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 430 (1962).
99. Chládek S., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **29**, 214 (1964).
100. Holý A., Smrt J., Coll. Czech. Chem. Comm., **31**, 3800 (1966).
101. Nishimura H., Sekiya T., Ukita T., Biochim. Biophys. Acta, **174**, 653 (1969).
102. Butzow J. J., Eichhorn G. I., Biopolymers, **3**, 95 (1965).
103. Huff J. W., Sastry K. S., Gordon M. P., Wacker W. E. C., Biochemistry, **3**, 501 (1964).
104. Farkas W. R., Biochim. Biophys. Acta, **155**, 401 (1968).
105. Dimroth K., Witzel H., Ann., **620**, 109 (1959).
106. Dimroth K., Jaenicke L., Vollbrechts-Hausen I., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., **289**, 71 (1952).
107. Jaenicke L., Dimroth K., Jaenicke D., Angew. Chem., **64**, 653 (1952).
108. Dimroth K., Witzel H., Angew. Chem., **68**, 579 (1956).
109. Kossel A., Neumann A., Ber., **26**, 2753 (1893).
110. Levene P. A., Jacobs W. A., J. Biol. Chem., **12**, 411 (1912).
111. Thannhauser S. J., Offenstein B., Z. physiol. Chem., **114**, 39 (1921).
112. Thannhauser S. J., Blanco G. G., Z. physiol., Chem., **161**, 116 (1926).
113. Levene P. A., J. Biol. Chem., **126**, 63 (1938).
114. Dekker C. A., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 947.
115. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **26**, 596 (1957).
116. Cohn W. E., Volkin E., Biochim. Biophys. Acta, **24**, 359 (1957).
117. Spencer J. H., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **68**, 18 (1963).
118. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **76**, 1 (1963).

119. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 91, 262 (1964).
120. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 23, 451 (1957).
121. Smith M., Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 80, 2612 (1958).
122. Michelson A. M., Tetrahedron, 2, 333 (1958).
123. Микельсон А., Химия нуклеозидов и нуклеотидов, Изд. «Мир», 1966, стр. 429—432.
124. Shapiro H. S., Rudner R., Miura K., Chargaff E., Nature, 205, 1068 (1965).
125. Meyerhof O., Lohmann K., Biochem. Z., 271, 98 (1934).
126. Foster A. B., Overlend W. G., Stacey M. J., J. Chem. Soc., 1951, 980, 987.
127. Fleury P., Courtois J., Desjobert A., Bull. Soc. chim. France, 1948, 694.
128. Shapiro H. S, in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossmann L., Moldave K. (eds), Academic Press, N. Y.—L., 1967, p. 205.
129. Burton K., Peterson G. B., Biochem. J., 75, 17 (1960).
130. Burton K., Biochem. J., 62, 315 (1956).
131. Peterson G. B., Biochem. J., 87, 495 (1963).
132. Lunt M. R., Siebke J.-C., Burton K., Biochem. J., 92, 27 (1964).
133. Peterson G. B., Burton K, Biochem. J., 92, 666 (1964).
134. Burton K., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossmann L., Moldave K. (eds), Academic Press, N. Y.—L., 1967, p. 222.
135. Jones A. S., Tittensor J. R., Walker R. T., Nature, 209, 298 (1966).
136. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 26, 608 (1957).
137. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 39, 62, 68 (1960).
138. Rudner R., Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 129, 85 (1966).
139. Burton K., Biochem. J., 74, 35P (1960).
140. Burton K., Biochem. J., 77, 547 (1960).
141. Brammer K. W., Jones A. S., Mian A. M., Walker R. T., Biochim. Biophys. Acta, 166, 732 (1968).
142. Jones A. S., Mian A. M., Walker R. T., J. Chem. Soc. (C), 1968, 2042.
143. Symons R. H., Ellery B. W., Biochim. Biophys. Acta, 145, 368 (1967).
144. Cape R. E., Spencer J. H., Fed. Proc., 26, 565 (1967).
145. Ванюшин Б. Ф., Бурьянов Я. И., Биохимия, 34, 546 (1969).
146. Bayley C. R., Jones A. S., Trans. Farad. Soc., 55, 492 (1959).
147. Tamm C., Shapiro H. S., Lipshitz R., Chargaff E., J. Biol Chem., 203, 673 (1953).
148. Hodes M. E., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, 22, 348 (1956).
149. Seidel H., Biochim. Biophys. Acta, 138, 98 (1967).
150. Linstead R. P., Owen L. N., Webb R. F., J. Chem. Soc., 1953, 1211.
151. Bayley C. R., Brammer K. W., Jones A. S., J. Chem Soc., 1961, 1903.
152. Habermann V., Biochim. Biophys. Acta, 55, 999 (1962).
153. Habermann V., Coll. Czech. Chem. Comm., 28, 510 (1963).
154. Габерман В., Биохимия, 28, 999 (1963).
155. Habermann V., Habermannova S., Cernova M., Biochim. Biophys. Acta, 76, 310 (1963).
156. Chargaff E., Rüst P., Temperli A., Morisava S., Danon A., Biochim. Biophys. Acta, 76, 149 (1963).
157. Chargaff E., Buchowicz J., Türler H., Shapiro H. S., Nature, 206, 145 (1965).
158. Shapiro H. S., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossman L., Moldave K. (eds), Academic Press, N. Y. — L, 1967, p. 212.
159. Cashmore A. R., Peterson G. B., Biochim. Biophys. Acta, 174, 591 (1969).

160. Darby G. K., Jones A. S., Tittensor J. K., Walker R. T., Nature, **216**, 793 (1967).
161. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochemistry, **5**, 3012 (1966).
162. Burton K., Hiley W. T., Biochem. J., 98, 70 (1966).
162a. Burton K., Varney N. F., Zamecnik P. C., Biochem. J., **99**, 29C (1966).
163. Livingston D. C., Biochim. Biophys. Acta, **87**, 538 (1964).
164. Coombs M. M., Livingston D. C., Biochim. Biophys. Acta, **174**, 161 (1969).
165. Ванюшин Б. Ф., Бурьянов Я. И., Биохимия, **34**, 718 (1969).
166. Бурьянов Я. И., Ванюшин Б. Ф., Боброва В. К., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **183**, 707 (1969).
167. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Turchinsky M. F., Biochem. Biophys. Res. Comm., **19**, 49 (1965).
168. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Гуськова Л. И., Турчинский М. Ф., Мол. биол., в печати.
169. Seifert W., Zillig W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **348**, 1017 (1967).
170. Будовский Э. И., Гуськова Л. И., Хазан И., Турчинский М. Ф., ХПС, в печати.
171. Будовский Э. И., Гуськова Л. И., Турчинский М. Ф., Мол. биол., в печати.
172. Philippsen P., Thiebe R., Wintermeyer W., Zachau H. G., Biochem. Biophys. Res. Comm., **33**, 923 (1968).
173. Whitfield P. R., Markham R., Nature, **171**, 1151 (1953).
174. Brown D. M., Fried M., Todd A. R., Chem. a. Ind., **1953**, 352.
175. Brown D. M., Fried M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 2206.
176. Whitfield P. R., Biochem. J., **58**, 390 (1954).
177. Hakamori S., in «Proceedings of the 8th Syimposium on Nucleic Acids», Kyoto (Japan), 1959, p. 16.
178. Yu C.-T., Zamecnik P. C., Biochim. Biophys. Acta, **45**, 148 (1960).
179. Ogur M., Small J. D., J. Biol. Chem., **235**, PC60 (1960).
180. Khym J. X., Cohn W. E., J. Biol. Chem., **236**, PC9 (1961).
181. Cohn W. E., Khym U. X., in «Acides ribonucléiques et polyphosphates. Structure, synthése et fonction», Colloques Internationaux du C. N. R. S., Strasbourg, 1961, C. N. R. S., Paris, 1962, p. 217.
182. Neu H. C., Heppel L. A., J. Biol. Chem., **239**, 2927 (1964).
183. Steinschneider A., Frankel-Conrat H., Biochemistry, **5**, 2735 (1966).
184. Khym J. X., Biochemistry, **2**, 343 (1963).
185. Brown D. M., Read A. P., J. Chem. Soc. (C), **1965**, 5072.
186. Whitfeld P. R., Biochim. Biophys. Acta, **108**, 202 (1965).
187. Khym J. X., Uziel M., Biochemistry, **7**, 423 (1968).
188. Weith H. L., Gilham P. T., J. Am. Chem. Soc., **89**, 5473 (1967).
189. Tomasz M., Chambers R. W., Biochim. Biophys. Acta, **108**, 510 (1965).
190. Tomasz M., Sanno Y., Chambers R. W., Biochemistry, **4**, 1710 (1965).
191. Reese C. B., Schofield K., Shapiro R., Todd A. R., Proc. Chem. Soc., **1960**, 290.
192. Jones A. S., Williamson A. R., Chem. a. Ind., **1960**, 1624.
193. Vizsolyi J. P., Tener G. M., Chem. a. Ind., **1962**, 263.
194. Moss G. P., Reese C. B., Schofield K., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1963**, 1149.
195. Albright J. D., Goldman L., J. Am. Chem. Soc., **87**, 4216 (1965).
196. Galriel T., Chen W. Y., Nussbaum A. L., J. Am. Chem. Soc., **90**, 6833 (1968).

197. Pfitzner K. E., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., **87**, 5661 (1965).
198. Greer S., Zamenhof S., Fed. Proc., **18**, 238 (1959).
199. Eigner J., Boedtker H., Michaelis G., Biochim. Biophys. Acta, **51**, 165 (1961).
200. Ademiec A., Shugar D., Naturwiss., **46**, 356 (1959).
201. Ademiec A., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **6**, 425 (1959).
202. Griffin B. E., in «Methods in Enzymology», v. 12, part A, Grossmann L., Moldave K. (eds), Academic Press, N. Y. — L., 1967, p. 141.
203. Haines J. A., Reese C. B., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1964**, 1406.
204. Brimacombe R. L., Griffin B. E., Haines J. A., Haslam W. J., Reese C. B., Biochemistry, **4**, 2452 (1965).
205. Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **7**, 491 (1960).
206. Griffin B. E., Reese C. B., Biochim. Biophys. Acta, **68**, 185 (1963).
207. Ukita T., Okuyama H., Hayatsu H., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **11**, 1400 (1963).
208. Griffin B. E., Reese P. B., Tetrahedron Letters, **1964**, 2925.
209. Holy H., Schert K.-H., Biochim. Biophys. Acta, **138**, 230 (1967).
210. Abell C. W., Rosini L. A., Ramseur M. R., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **54**, 608 (1965).
211. Lowely P. D., in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», v. 5, Davidson J. N., Cohn W. E. (eds), Academic Press, N. Y. — L., 1966, p. 89.
212. Kriek E., Emmelot P., Biochemistry, **2**, 733 (1963).
213. Lett J. T., Parkins G. M., Alexanour P., Arch. Biochem. Biophys., **97**, 80 (1962).
214. Rutman R. J., Chun E. H. L., Jones J., Biochim. Biophys. Acta, **174**, 663 (1969).
215. Price C. C., Gausher G. M., Koneru P., Shibakawa R., Sowa J. R., Yamaguchi M., Biochim. Biophys. Acta, **166**, 327 (1968).
216. Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4652 (1959).
217. Smith M., Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6204 (1958).
218. Ralph R. K., Young R. J., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **85**, 202 (1963).
219. Ralph R. K., Young R. J., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1490 (1962).
220. Преображенская Н. Н., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., ХПС, **1965**, 342.
221. RajBhandary U. L., Young R. J., Khorana H. G., J. Biol. Chem., **239**, 3875 (1964).
222. Chiang P.-C., Hu P.-C., Chi T.-H., Liang C.-C., Sheng Wu Hua Hsueh Wu Wu Li Hsue Pao, **4**, 574 (1964); C. A., **62**, 14981g (1965).
223. Narang S. A., Dheer S. K., Michnewicz J. J., J. Am. Chem. Soc., **90**, 2702 (1968).
224. Neulart M.-M., Biochim. Biophys. Acta, **149**, 422 (1967).
225. Ooka T., Neulart-Portier M.-M., Biochim. Biophys. Acta, **182**, 542 (1969).
226. Cerny R., Mushynski W. E., Spencer J. H., Biochim. Biophys. Acta, **169**, 439 (1968).
227. Salomon R., Kaye A. M., J. Mol. Biol., **43**, 581 (1969).
228. Hoard D. E., Ratliff R. L., Williams L., Hayes F. N., J. Biol. Chem., **244**, 5368 (1969).
229. Uziel M., Khym J. X., Biochemistry, **8**, 3254 (1969).

НЕКОТОРЫЕ РЕАКЦИИ РЕДКИХ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

I. ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих главах были описаны химические реакции, характерные для основных и большей части редких компонентов нуклеиновых кислот. Однако некоторые редкие компоненты обладают необычными химическими свойствами, обусловленными присутствием в их молекуле функциональных групп, отсутствующих в других нуклеозидах. Эти реакции, выходящие за рамки принятой в данной книге классификации, кратко рассматриваются в данной главе.

II. РЕАКЦИИ 6-*ЭКЗО*-N-ИЗОПЕНТЕНИЛАДЕНОЗИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Необычные химические свойства 6-*экзо*-N-изопентениладенозина связаны с присутствием в алкильном заместителе этиленовой связи, которая довольно легко подвергается атаке под действием электрофильных реагентов. Образующийся карбкатион II достаточно легко присоединяет нуклеофильный агент, давая аддукт III, но может также претерпевать внутримолекулярное алкилирование атома N-1 гетероциклического ядра аденина (см. гл. 5) с образованием трициклического соединения типа IV. Аддукт III также может достаточно легко переходить в соединение IV через карбкатион II.

В настоящее время известны по крайней мере две реакции такого типа. При кислотном гидролизе 6-*экзо*-N-изопентениладенозина Ia в условиях, обычно применяемых для расщепления N-гликозидных связей в пуриновых нуклеозидах (см. гл. 8), не удается получить соответствующий агликон Iб[1, 2], так как образуется смесь продуктов его гидратации (IIIa) и циклизации (IVa). Детальное кинетическое исследование этого процесса[3] позволило сделать вывод, что расщепление N-гликозидной связи протекает быстрее, чем атака протона по двойной связи. Удалось подобрать условия, в которых образуется только основание Iб или смесь Iб и IIIa, причем IIIa возникает в результате последовательных реакций: Ia⟶Iб⟶IIIa. Смесь Iб и IIIa может быть количественно переведена

в циклический продукт IVа под действием фторборной или трифторуксусной кислот.

I: а (R–остаток рибозы); б (R=H)

II

III: а (R=X=H, Y=OH); б (X=Y=OH, R–остаток рибозы)

IV: а (R=X=H); б (X=I, R–остаток рибозы)

По аналогичному механизму протекает, вероятно, взаимодействие 6-*экзо*-N-изопентениладенозина с иодом [1, 4].

Реакция заканчивается практически мгновенно при комнатной температуре и нейтральном pH. Прочие нуклеозиды в этих условиях не затрагиваются, что позволяет применять реакцию с иодом для высокоспецифической модификации тРНК [4]. Механизм этой реакции изучен довольно плохо; показано, однако [1], что первичным продуктом является смесь стереоизомеров трициклического иодида IVб, которые могут претерпевать дальнейшие превращения с отщеплением иода.

Модификация остатка 6-*экзо*-N-изопентениладенозина в составе тРНК под действием иода позволила впервые обнаружить различие элементов структуры тРНК, необходимых для выполнения акцепторной и адапторной функций. Оказалось, что после кратковременного действия иода на серинспецифическую тРНК из дрожжей способность ее присоединять серин практически не изменяется, в то время как способность образовывать комплекс с рибосомами в при-

сутствии соответствующего кодирующего рибополинуклеотида оказывается утраченной [4].

При кратковременном действии перманганата на 6-*экзо*-N-изопентениладенозин в нейтральной среде удается получить [1] продукт гидроксилирования двойной связи IIIб; наряду с ним образуется аденозин и небольшое количество неидентифицированного продукта.

III. РЕАКЦИИ ПСЕВДОУРИДИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ *

Отличие химического поведения псевдоуридина от поведения обычных пиримидиновых нуклеозидов связано с двумя особенностями его структуры: наличием двух атомов азота, связанных с водородом, и присутствием С-гликозидной связи. Особенности реакций замещения в гетероциклическом ядре псевдоуридина уже рассматривались в гл. 5; здесь мы остановимся только на превращениях, обусловленных наличием С-гликозидной связи. К их числу относятся: легкая изомеризация углеводного остатка в составе нуклеозида и необычное для других пиримидиновых нуклеозидов поведение при каталитическом гидрировании и окислении периодатом. Все эти превращения удается хорошо объяснить, исходя из предположения о легком раскрытии фуранозного цикла в псевдоуридине V с образованием промежуточного продукта с сопряженными двойными связями (VI) или его катиона (VII):

V ⇄ [VI] ⇄ VII (H^+ / $-H^+$)

Движущей силой этого процесса может служить протонирование циклического кислорода остатка рибозы или потеря протона атомом N-1 гетероциклического ядра.

Уже при установлении строения псевдоуридина [6] было отмечено, что это соединение довольно легко претерпевает мутаротацию — образуются изомеры, различающиеся размером цикла углеводного остатка и конфигурацией гликозидной связи. Природный изомер псевдоуридина 5-(β-*D*-рибофуранозил)-урацил V (так называемый псевдоуридин С) [6, 7] частично превращается после нагревания в

* Обзор — см. [5].

течение 1 *ч* в 1 н. соляной кислоте в 5-(α-*D*-рибофуранозил)-урацил VIII (псевдоуридин B) [6,7], 5-(β-*D*-рибопиранозил)-урацил IX (псевдоуридин A_S) [6,8,9] и 5-(α-*D*-рибопиранозил)-урацил X (псевдоуридин A_F) [6,8,9]. Соотношение изомеров V : VIII : IX : X в образующейся смеси составляет приблизительно 2 : 1 : 2 : 1. Аналогичная смесь образуется при изомеризации в тех же условиях всевдоуридина B; изомеризация пиранозных изомеров псевдоуридина идет заметно медленнее, и равновесие за 1 *ч* не достигается.

V

VIII

VI

IX

X

Аналогичная изомеризация протекает и в щелочной среде [6,8]; в этом случае процесс, очевидно, также проходит через промежуточный продукт VI.

При каталитическом гидрировании псевдоуридина в условиях, приводящих обычно к насыщению двойной связи С-5—С-6 в пири-

мидиновом цикле (см. стр. 336), на 1 *моль* соединения поглощается 1 *моль* водорода и образуется 5-(*D*-рибитил)-урацил XI [6]; этот процесс также можно объяснить промежуточным образованием соединения VI, диеновая система которого восстанавливается в 1,4-положения.

V → [VI] → XI

Окисление псевдоуридина С периодатом в обычных условиях (см. стр. 531) приводит к соответствующему диальдегиду XII; наряду с ним образуются два продукта неустановленного строения [6]. После восстановления диальдегида действием $NaBH_4$ образуется с небольшим выходом 5-(α, β-диоксиэтил)-урацил XV. Это же соединение получено в результате последовательной обработки псевдоуридинов A_F и A_S периодатом, боргидридом натрия и щелочью [9]. Образование XV можно объяснить распадом диола XIII под действием щелочи и последующей гидратацией возникающего непредельного соединения XIV.

V —$NaIO_4$→ XII (OHC, CHO) —$NaBH_4$→ XIII (HOH_2C, CH_2OH; HO^-) →

→ [XIV (=CH–CH_2OH)] —H_2O→ XV (CHOH–CH_2OH)

В более жестких условиях под действием периодата расщепляются и производные псевдоуридина, не содержащие незамещенной *цис*-гликольной группировки, например псевдоуридин-3'-фосфат XVI [10]. Так, при pH 8,9 и 50° С 1 *моль* этого соединения поглощает 4,3 *моль* периодата в течение 23 *ч*; среди продуктов реакции были идентифицированы неорганический фосфат (0,9 *моль*), формальдегид (0,35 *моль*), 5-формилурацил XIX (0,3 *моль*) и урацил-5-карбоновая кислота XX (0,5 *моль*). Образование первых трех продуктов реакции может быть объяснено переходом псевдоуридин-3'-фосфата в щелочной среде в соединение XVII и его последующей гидратацией. Образующийся тетраол XVIII окисляется далее, давая 5-формилурацил, формальдегид и фосфорилоксималоновый диальдегид, а неорганический фосфат получается при распаде фосфорилоксималонового диальдегида:

Урацил-5-карбоновая кислота может образоваться за счет дальнейшего окисления 5-формилурацила или прямого гидроксилирования по С-1' исходного соединения XVI (с последующим разложением). Такое окисление нетипично для действия периодата, однако следует помнить, что реакция проводится в условиях, значительно отличающихся от обычно применяемых для окисления

1,2-гликолей. Удалось показать, что при pH 8,9 и 50° С даже тимин медленно переходит под действием периодата в урацил-5-карбоновую кислоту:

$$\text{тимин (5-}CH_3\text{)} \longrightarrow \text{5-}CH_2OH \longrightarrow \text{5-}CHO \longrightarrow \text{5-}COOH$$

Данные по периодатному окислению псевдоуридин-3′-фосфата и уридин-2′(3′)-фосфата приведены в табл. 11.1. При pH 7,5 урацил-5-карбоновая кислота является единственным продуктом окисления псевдоуридин-3′-фосфата, поглощающим в ультрафиолетовой области; одновременно становится заметным и другой процесс — разрушение соединения с потерей характерного поглощения в УФ-области спектра. Образующиеся при этом продукты не идентифицированы, и механизм реакции остается неясным (см. также [18]).

Таблица 11.1. **Окисление псевдоуридин-3′-фосфата и уридин-2′ (3′)-фосфата периодатом при 50 ° С[10]**

pH среды	Продолжительность реакции, ч	Состав результирующей смеси, %			Суммарный выход продуктов, поглощающих в УФ-области, %
		урацил-5-карбоновая кислота	5-формилурацил	исходное соединение	
Окисление псевдоуридин-3′-фосфата					
8,9	23	44	28	9	82
7,5	29	23	0	19	42
7,3	27	18	0	34	52
7,0	30	следы	0	44	44
Окисление уридин-2′ (3′)-фосфата					
8,9	23	—	—	66	66
7,5	21	—	—	73	73

Существенно, что последняя реакция деструкции неспецифична и наблюдается для всех нуклеозид-2′(3′) фосфатов. Быстрее всего разрушается уридин-2′(3′)-фосфат: за 100 ч при pH 7 и 50° С исчезает 79% исходного нуклеотида. В тех же условиях цитидин-2′(3′)-фосфат расщепляется на 53%; гуанозин-2′(3′)-фосфат — на 25%, и аденозин-2′(3′)-фосфат — на 6%. Вследствие этого применение периодатного окисления для специфического расщепления остатков псевдоуридина в тРНК не представляется возможным [16].

IV. РЕАКЦИИ 5-ОКСИМЕТИЛПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Гидроксильная группа в производных 5-оксиметилпиримидинов заметно отличается по своему химическому поведению от гидроксильных групп углеводного остатка в нуклеозидах и нуклеотидах. Для 5-оксиметилпиримидинов весьма характерны реакции нуклеофильного замещения у атома углерода, протекающие по мономолекулярному механизму. Это связано с относительно высокой устойчивостью катиона XXI, образующегося из производных 5-оксиметилпиримидинов при действии кислот:

$\xrightarrow{H^+} H_2O +$

XXI

R—атом водорода или различные радикалы

К числу таких реакций нуклеофильного замещения относится легкое образование метиловых и этиловых эфиров из производных 5-оксиметилуридина при действии соответствующих спиртов и соляной кислоты [11–13]. Аналогично могут быть получены и ацетаты [11]. Обработка 2′,3′-O-изопропилиден-5-оксиметилуридина уксусной кислотой в присутствии каталитических количеств трифторуксусной кислоты приводит к избирательному ацетилированию по оксиметильной группе пиримидинового ядра [14]:

$\xleftarrow[HCl]{C_2H_5OH}$ $\xrightarrow[CF_3COOH]{CH_3COOH}$

R — углеводный остаток

При взаимодействии защищенных (по остатку сахара) производных 5-оксиметилдезоксиуридина с хлористым тионилом или хлористым водородом в диоксане легко образуются соответствующие 5-хлорметилнуклеозиды [13] XXII; описана конденсация производных 5-оксиметилуридина с фенолами [15], приводящая к продуктам типа XXIII.

XXII XXIII

R и R′ — углеводные остатки

При гидрировании 5-оксиметилуридина конкурируют два процесса [11, 16]: насыщение двойной связи с образованием 5-оксиметил-5,6-дигидроуридина [16] XXIV и гидрогенолиз, приводящий к 5-метилуридину XXV (риботимидину), который может подвергаться дальнейшему восстановлению:

XXIV XXV

R — остаток рибозы

При использовании платинового или родиевого катализатора и проведении гидрирования в уксусной кислоте гидрогенолиз оксиметильной группы является преобладающей реакцией [14]; напротив, в нейтральном растворе над родиевым катализатором в основном происходит насыщение двойной связи [16].

При окислении 5-оксиметилуридина действием кислорода над платиной в уксусной кислоте главным продуктом реакции является

альдегид XXVI [11, 17]; окисление под действием двуокиси марганца приводит к уридин-5-карбоновой кислоте XXVII [11]:

XXVI ← → XXVII

R — остаток рибозы

При проведении окисления над платиновым катализатором в щелочной среде 5-оксиметильная группа окисляется до карбоксильной [17]; одновременно протекает окисление по остатку сахара.

ЛИТЕРАТУРА

1. Robins M. J., Hall R. H., Thedford R., Biochemistry, 6, 1837 (1967).
2. Biemann K., Tsunakawa S., Sonnenbichler J., Feldmann H., Dutting D., Zachau H. G., Angew. Chem., 78, 600 (1966).
3. Martin D. M. G., Reese C. B., J. Chem. Soc. (C), 1968, 1731.
4. Fittler F., Hall R. H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 25, 441 (1966).
5. Chambers R. W., Progr. Nucl. Acid Res., 5, 349 (1966).
6. Cohn W. E., J. Biol. Chem., 235, 1488 (1960).
7. Michelson A. M., Cohn W. E., Biochemistry, 1, 490 (1962).
8. Chambers R. W., Kurkov V., Shapiro R., Biochemistry, 2, 1192 (1963).
9. Chambers R. W., Kurkov V., Biochemistry, 3, 326 (1964).
10. Tomasz M., Sanno Y., Chambers R. W., Biochemistry, 4, 1710 (1965).
11. Cline R. E., Fink R. M., Fink K., J. Am. Chem. Soc., 81, 2521 (1959).
12. Baker B. R., Schwan T. J., Santi D. V., J. Med. Chem., 9, 66 (1966).
13. Brossmer R., Röhm E., Z. physiol. Chem., 348, 1431 (1967).
14. Scheit K. H., Chem. Ber., 99, 3884 (1966).
15. Brossmer R., Angew. Chem., 79, 691 (1967).
16. Green M., Barner H. D., Cohen S. S., J. Biol Chem., 228, 621 (1957).
17. Iwai K., Honjo M., Chem. Pharm. Bull., 13, 7 (1965).
18. Dugaiczyk A., Eyler J. J., J. Biol. Chem., 244, 2750 (1969).

ФОТОХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

I. ВВЕДЕНИЕ

Фотохимия изучает процессы, происходящие в молекулах при поглощении ими света. Нуклеиновые кислоты обладают интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра, что обусловлено ароматической природой входящих в их состав пуриновых и пиримидиновых гетероциклических оснований. Предметом фотохимии нуклеиновых кислот являются изменения, происходящие в молекулах нуклеиновых кислот или их компонентов при облучении ультрафиолетовым светом.

Исследования действия ультрафиолетового облучения на нуклеиновые кислоты и их компоненты интенсивно развиваются в последнее время (обзоры — см. [1–8]) в трех основных направлениях: 1) влияние УФ-облучения на функциональные свойства нуклеиновых кислот (см., например, [353]); 2) органическая фотохимия компонентов нуклеиновых кислот; 3) физика возбужденных состояний нуклеиновых кислот и их компонентов. В данной главе рассмотрена собственно органическая фотохимия пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов. Особое внимание обращено на изменение химических свойств компонентов нуклеиновых кислот при переходе их в возбужденное состояние.

II. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОТОХИМИИ *

В соответствии с первым законом фотохимии (закон Гротгуса — Дрепера) фотохимические изменения происходят только под действием света, поглощаемого системой; в результате поглощения кванта (фотона) система переходит в возбужденное состояние. Согласно второму закону фотохимии (закон фотохимической эквивалентности Эйнштейна) каждый поглощенный квант способен активировать одну молекулу.

Далее активированные молекулы (т. е. находящиеся в возбужденном состоянии) могут расходовать полученную энергию различными путями, в том числе вступая в разнообразные химические реакции. Различают первичные фотохимические процессы, в которых участвуют непосредственно молекулы в возбужденном состоянии, и вторичные («темновые») реакции, т. е. превращения продуктов, образовавшихся в результате первичных процессов.

* Более подробно об основах фотохимии см. [9–11].

Энергия, необходимая для возбуждения одной молекулы, т. е. энергия одного кванта q при данной длине волны может быть записана уравнением (1)

$$E_2 - E_1 = q = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \qquad (1)$$

где E_2 и E_1 — энергии соответственно возбужденного и основного состояний молекулы; h — постоянная Планка; ν и λ — частота и длина волны поглощенного излучения; c — скорость света.

Энергия, необходимая для возбуждения 1 *моль* вещества при данной длине волны, называется эйнштейном (E):

$$1E = qN = \frac{hc}{\lambda} N \qquad (2)$$

где N — число Авогадро.

Для λ, равной 2000 и 7000 Å (коротковолновая граница ближней ультрафиолетовой области и начало инфракрасной области), 1 E равен 143 *ккал/моль* и 40,8 *ккал/моль* соответственно. Для λ, равной 2537 Å (длина волны, часто применяемая в фотохимии нуклеиновых кислот), 1 E равен 113 *ккал/моль*.

Как было сказано выше, энергия, поглощенная молекулой при возбуждении, может расходоваться различными путями, т. е. не каждый поглощенный квант вызывает химическую реакцию. Отношение числа прореагировавших молекул к числу поглощенных квантов (на единицу объема) называется квантовым выходом процесса:

$$\varphi = \frac{\text{число прореагировавших молекул}}{\text{число поглощенных квантов}} = \frac{\text{число прореагировавших молей}}{\text{число поглощенных эйнштейнов}} \left(\frac{\text{моль}}{E}\right) \qquad (3)$$

Если каждый поглощенный квант вызывает фотохимическую реакцию, квантовый выход реакции равен единице (или двум в случае фотодимеризации). Квантовый выход φ первичного фотохимического процесса может отличаться от полного (измеряемого) квантового выхода Φ вследствие протекания вторичных реакций. Необходимо подчеркнуть разницу между квантовым выходом реакций и химическим выходом конечного продукта.

При изучении механизма и кинетики фотохимических реакций, в частности в фотохимии нуклеиновых кислот [12], пользуются понятием поперечного сечения, которое определяется долей прореагировавших молекул на единицу дозы (количество эйнштейнов на единицу поверхности):

$$\sigma = \left(\frac{d\,[M]/dL}{[M_0]}\right)_{L \to 0} \qquad (4)$$

где $[M]$ — концентрация прореагировавших молекул; $[M_0]$ — концентрация исходных молекул; L — доза.

Обычно в фотохимических исследованиях σ измеряют в *см²/мкE*.

Поскольку при постоянной интенсивности облучения доза пропорциональна времени, поперечное сечение фотореакции пропорционально скорости превращения при данной интенсивности излучения.

Возбужденные состояния. Частоты, характерные для ультрафиолетового излучения, соответствуют частотам электронных переходов, т. е. ультрафиолетовый свет возбуждает колебания электронов, вызывая переход их на более высокий энергетический уровень.

Основное (невозбужденное) состояние молекулы в соответствии с принципом Паули является синглетным S_0, т. е. спины обоих электронов, находящихся на

одной орбитали, антипараллельны *. При возбуждении молекулы один из электронов переходит на другую орбиталь, запрет Паули снимается, и возбужденная молекула может находиться либо в возбужденном синглетном состоянии (спины электронов антипараллельны), либо в возбужденном триплетном (спины электронов параллельны).

В большинстве органических фотохимических процессов, протекающих в растворе, участвует или самое нижнее возбужденное синглетное состояние S_1, или самое нижнее возбужденное триплетное состояние T_1. Каждое возбужденное состояние характеризуется определенной энергией, временем жизни и электронным распределением, отличным от такового в основном состоянии. Таким образом, молекула в основном и возбужденном состояниях — это две отличные друг от друга химические индивидуальности, обладающие различной реакционной способностью. Реакционная способность в возбужденном состоянии, вообще говоря, выше вследствии избытка энергии и наличия неспаренных электронов. Энергия триплетного состояния обычно меньше энергии соответствующего синглетного состояния, что связано с бо́льшим удалением электронов друг от друга и меньшим взаимным отталкиванием в триплетном состоянии. На рис. 12.1 представлена схема уровней энергии, иллюстрирующая процессы поглощения энергии при возбуждении и некоторые пути ее расходования при переходе из возбужденного состояния в основное. Возбужденное состояние является метастабильным, т. е. в течение определенного времени, называемого временем жизни возбужденного состояния, возбужденная молекула расходует энергию, полученную при поглощении кванта, и переходит в основное состояние. Эта энергия может расходоваться несколькими путями.

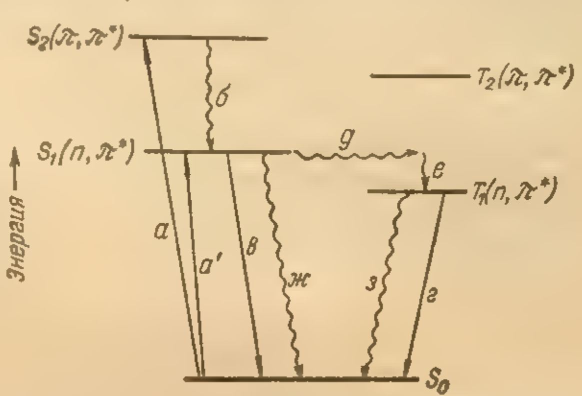


Рис. 12.1. Схема уровней энергии для ненасыщенных соединений, содержащих гетероатомы. Горизонтальными линиями обозначены энергии самых нижних колебательных уровней каждого состояния (энергии более высоких колебательных уровней не показаны). Прямые стрелки обозначают электронные переходы, сопровождающиеся поглощением или испусканием кванта. Волнистые стрелки соответствуют безызлучательным переходам [9]. Обсуждение показанных переходов — см. текст.

Излучательные переходы. Молекула может перейти из возбужденного состояния в основное, отдавая избыточную энергию в виде излучения с большей длиной волны по сравнению с поглощенной (см. рис. 12.1, переходы *в* и *г*) **:

$$M^* \longrightarrow M_0 + h\nu$$

где M^* и M_0 — молекула в возбужденном и основном состоянии соответственно.

Излучение, сопровождающее переход $S_1 \rightarrow S_0$ (рис. 12.1, переход *в*), называется флуоресценцией. Время жизни флуоресценции для большинства органических молекул составляет 10^{-9} — 10^{-6} *сек*. Излучение, сопровождающее переход $T_1 \rightarrow S_0$ (рис. 12.1, переход *г*), принято называть фосфоресценцией. Время жизни фосфоресценции для большинства органических молекул составляет 10^{-3} — 10 *сек*.

* Исключение могут составлять, например, парамагнетики, т. е. вещества, обладающие неспаренными электронами.

** Здесь и далее звездочкой помечены величины и обозначения, относящиеся к возбужденным состояниям.

Безызлучательные переходы. Различают несколько типов безызлучательных переходов [9, 10]. Некоторые из них, наиболее важные для понимания дальнейшего материала, следующие.

1. Молекула может переходить из одного состояния в другое, расходуя избыточную энергию в виде тепла при столкновении с другими молекулами (рис. 12.1, переходы *ж* и *з*):

$$M^* \longrightarrow M_0 + Q \text{ (тепло)}$$

2. Внутримолекулярный переход $S_1 \rightarrow T_1$ (рис. 12.1, переходы *д* и *е*), называемый интеркомбинационной конверсией. Этот переход заслуживает особого внимания, поскольку возбужденное триплетное состояние T_1, как наиболее долгоживущее, несомненно, играет важную роль в фотохимических реакциях, а непосредственное заселение его из основного состояния ($S_0 \rightarrow T_1$) является сильно запрещенным процессом.

3. Возбужденная молекула может передать избыточную энергию другой молекуле:

$$M^* + M_a \longrightarrow M_0 + M_a^*$$

Если перенос энергии инициирует химическую реакцию молекулы акцептора M_a, такая реакция называется фотосенсибилизированной.

Фотохимическая реакция. Молекула, находящаяся в возбужденном состоянии, может расходовать избыточную энергию, полученную при возбуждении, вступая в химическую реакцию. Однако далеко не всякая молекула, будучи переведенной в возбужденное состояние, претерпевает затем химические изменения. Значительная часть возбужденных молекул, не успевая вступить в химическую реакцию, возвращается в исходное состояние. Однако даже кратковременное пребывание молекул в возбужденном состоянии вследствие их высокой реакционной способности открывает возможности проведения в мягких условиях весьма интересных специфических химических превращений.

III. СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

Из изложенного очевидно, что для фотохимических исследований необходимо детальное изучение спектров поглощения исследуемого вещества. Это позволяет не только правильно выбрать диапазон длин волн для возбуждения молекул, но и судить о механизме и возможных результатах первичных фотохимических процессов. Обсуждение огромного материала по УФ-спектрам [2, 13-18] поглощения нуклеиновых кислот и их компонентов в рамках данной главы не представляется возможным. В этом разделе приведены лишь краткие основные сведения, необходимые для понимания материала, изложенного далее.

Нуклеиновые кислоты и их компоненты интенсивно поглощают в ближней ультрафиолетовой области (200—300 *ммк*); максимум абсорбции, как правило, находится в области около 260 *ммк*.

УФ-Поглощение нуклеиновых кислот и их компонентов обусловлено поглощением пуриновых и пиримидиновых оснований, а именно

$\pi - \pi^*$- и $n - \pi^*$-электронными переходами в них[a]. $\pi - \pi^*$-Переходы соответствуют возбуждению π-электронов с π-связывающих орбиталей на π^*-разрыхляющие, а $n - \pi^*$-переходы — с несвязывающих n-орбиталей (например, из свободной пары электронов азота гетероциклического ядра или кислорода карбонильной группы — см. гл. 3). Полосы, соответствующие $\pi - \pi^*$-переходам, значительно более интенсивны. Максимум поглощения в области 260 *ммк* обусловлен главным образом $\pi - \pi^*$-переходами и лишь отчасти переходами $n - \pi^*$-типа. Последние проявляются иногда на кривых поглощения в виде плеч в более длинноволновой области (280—320 *ммк*) [19–22].

Поскольку спектры поглощения обусловлены электронными переходами, они зависят от факторов, влияющих на электронное распределение. Существенное влияние на спектры, в частности на относительную энергию $\pi - \pi^*$- и $n - \pi^*$-переходов, оказывают заместители в пуриновом или пиримидиновом ядре [23–27]. Характер влияния определяется природой и положением заместителей. Как правило, наибольшее влияние оказывают заместители $—NH_2$ или —OH при C-2 и C-4 для пиримидинов и их производных и соответственно при C-2 и C-6 для пуринов. Алкильный или рибозильный заместитель при N-1 пиримидина или при N-9 пурина влияет значительно слабее [25, 26], поэтому спектры нуклеозидов близки к спектрам оснований. Следует, однако, отметить, что в спектрах поглощения ряда соединений все же отражается взаимодействие углеводного остатка с основанием, как например, в случае цитидина, метилцитидина и цитидин-2′(3′)-фосфата [28–30].

Спектры компонентов нуклеиновых кислот зависят от pH [28, 31], поскольку переход от нейтральной формы основания к протонированной или депротонированной сказывается на распределении электронной плотности в гетероциклических ядрах, а соотношение форм является функцией pH раствора. Протонирование свободной пары электронов атома азота гетероциклического ядра, естественно, сильно сказывается на $n - \pi^*$-электронных переходах (см. гл. 3). Сольватация, особенно в полярных растворителях, также существенно влияет на $n - \pi^*$-переходы, вследствие чего плечи на кривых поглощения, соответствующие $n - \pi^*$-переходам, проявляются более четко в неполярных растворителях [23, 27]. Важные изменения спектров происходят, кроме того, при межплоскостных и комплементационных взаимодействиях оснований в полинуклеотидах (см. гл. 4).

Наиболее существенно на спектрах поглощения компонентов нуклеиновых кислот сказывается нарушение ароматичности гетероциклического основания, наблюдаемое, например, при насыщении двойной связи C-5—C-6 в пиримидиновых производных [32, 33].

[a] Следует отметить, что при УФ-облучении возбуждаются главным образом π-электроны. Этот момент важен при рассмотрении реакционной способности оснований нуклеиновых кислот и их производных в возбужденном состоянии.

IV. ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

Как уже указывалось, возбуждение молекулы (например, гетероциклического основания нуклеиновых кислот) меняет ее электронную структуру, что приводит к изменению ее важнейших физических и химических свойств, и в частности константы диссоциации, константы таутомерного равновесия, реакционной способности и т. д. Разные возбужденные состояния различаются энергией, электронным распределением и временем жизни. Поэтому очевидно, что возбужденная молекула должна обладать различными свойствами в зависимости от того, в каком возбужденном состоянии она находится. Следовательно, для изучения поведения нуклеиновых кислот в возбужденном состоянии, и в частности механизма фотохимических реакций, важно знать, через какое возбужденное состояние протекает та или иная реакция, характеристику этого возбужденного состояния и, наконец, что представляет собой молекула основания или его производного в данном возбужденном состоянии.

Основными источниками информации о характере возбужденных состояний нуклеиновых кислот и их компонентов являются спектры поглощения и люминесценции, спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [34]. Весьма перспективен метод импульсного фотолиза (краткий обзор — см. [9]), лишь недавно получивший применение в фотохимии нуклеиновых кислот.

1. Характеристика возбужденных состояний

Мономерные компоненты

Большинство компонентов нуклеиновых кислот люминесцирует только при низких температурах, так как в растворах при комнатной температуре энергия возбуждения рассеивается в основном в результате безызлучательных процессов. Поэтому сведения, приведенные ниже, относятся главным образом к возбужденным состояниям компонентов нуклеиновых кислот в замороженных растворах при низких температурах (~80° K).

Спектры люминесценции ряда 5′-нуклеотидов представлены на рис. 12.2 (о спектрах люминесценции оснований, нуклеозидов и нуклеотидов см. также [36–41]).

На основании спектров поглощения и люминесценции были определены важнейшие параметры, характеризующие возбужденные состояния нуклеотидов. Некоторые из них представлены в табл. 12.1.

Из сравнения спектров поглощения и флуоресценции при низких температурах следует, что геометрия молекулы при переходе в возбуженное синглетное состояние существенно не меняется [39].

Рис. 12.2. Спектры люминесценции (флуоресценции и фосфоресценции) мононуклеотидов в смеси этиленгликоль — вода (1 : 1) при 80° К [35].

В большинстве работ состояние S_1 описывается как π,π^*-состояние [36, 38, 42]. Однако ряд данных указывает на возможность значительно менее интенсивного возбуждения несвязывающих электронов атомов азота и кислорода гетероциклических оснований, т. е. на существование n,π^*-состояний [27, 43]. Причем в зависимости от природы заместителей в гетероциклическом ядре относительные энергии n,π^*- и π,π^*-уровней могут меняться, т. е. нижним возбужденным синглетным состоянием может быть π,π^*- или n,π^*-состояние [27].

Таблица 12.1. **Параметры возбужденных синглетного и триплетного состояний некоторых 5′-нуклеотидов** [35]

E — энергия возбуждения; $^1\varphi_p$ и $^3\varphi_p$ — квантовые выходы флуоресценции и фосфоресценции; $^1\varphi_{икк}$ — квантовый выход интеркомбинационной конверсии; $1-(^1\varphi_p+{^1\varphi_{икк}})$ и $1-\frac{^3\varphi_p}{^1\varphi_{икк}}$ — квантовые выходы безызлучательного перехода в основное состояние из синглетного и триплетного состояний; $^1\tau_p$ — время жизни флуоресценции; $^1\tau$ — время жизни синглетного возбужденного состояния; $^3\tau$ — время тушения триплетного возбужденного состояния

Нуклеотид	pH среды	Синглетное состояние						Триплетное состояние			
		$^1E\cdot10^3$, $см^{-1}$	$^1\varphi_p$	$^1\varphi_{икк}$	$1-(\varphi_p+\varphi_{икк})$	$^1\tau_p$, нсек	$^1\tau$, нсек	$^3E\cdot10^3$, $см^{-1}$	$^3\varphi_p$	$1-\frac{^3\varphi_p}{\varphi_{икк}}$	$^3\tau$, сек
pA	—	35,2	0,01	0,02	0,97	3,0	2,8	26,7	0,015	0,35	2,4
pG	—	34,0	0,13	0,15	0,72	12,0	5,0	27,2	0,07	0,5	1,3
pC	—	33,7	0,05	—	0,95	5,5	—	27,9	0,01	—	0,34
pdT	7,0	34,1	0,16	0	0,81	4,5	3,2	26,3	—	—	0,33
	12,0	34,4	0,24	0,15	0,61	5,5	2,9	27,0	0,003	0,8	0,5
pU	7,0	34,9	0,01	0	0,99	4,5	—	—	—	—	—
	12,0	35,0	—	—	—	4,5	—	—	—	—	—

Возбужденное триплетное состояние нуклеотидов, как правило, является π,π^*-состоянием [27, 34, 35]. Энергия возбужденного триплетного состояния значительно ниже, чем синглетного.

Важно подчеркнуть, что в ряду рассмотренных соединений наименьшей энергией триплетного состояния обладает тимидин-5′-фосфат в нейтральной форме. Интенсивность заселения возбужденного триплетного состояния характеризуется квантовым выходом интеркомбинационной конверсии $\varphi_{икк}$. Для pdT и pU при pH 7 эти величины равны нулю (см. табл. 12.1), т. е. в разбавленных растворах при низких температурах возбуждение изолированных молекул этих соединений на триплетный уровень возможно, по-видимому, только путем сенсибилизации. Однако в концентрированных замороженных растворах pdT и pU наблюдается фосфоресценция, что свидетельствует о заселении в этих условиях триплетного уровня [39].

Возбужденные состояния нуклеотидов в растворах при температурах выше 0° С исследованы в значительно меньшей степени.

Ряд данных свидетельствует об изменении их свойств при повышении температуры от 77 до 298° К.

В растворах нейтральных форм большинства нуклеотидов флуоресценция и фосфоресценция почти полностью гасятся[35, 36, 39]. Одной из возможных причин этого явления является увеличение скорости внутренней конверсии, которое должно приводить к уменьшению величины $^1\tau$ по крайней мере на два порядка (до 10^{-11} *сек*) и уменьшению величины $\varphi_{икк}$, если только последняя не увеличивается с температурой[44]. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что возможно получить при комнатной температуре значения $\varphi_{икк}$, сравнимые с соответствующими величинами при 77° К[45].

Предполагается, что с повышением температуры и понижением вязкости среды энергия возбужденного синглетного состояния нуклеотидов уменьшается вследствие реориентации молекул растворителя, окружающих молекулу нуклеотида[35]. Одним из доводов в пользу такого заключения является сдвиг в красную область максимума флуоресценции протонированного аденина при повышении температуры от 80 до 271° К[35].

В водных растворах флуоресценция была обнаружена для протонированных форм аденина, гуанина и соответствующих нуклеотидов[46, 311], а также для анионов гуанина[46] и тимина[47]. Аналогичную флуоресценцию проявляют нейтральные формы замещенных нуклеотидов, близкие по строению к протонированным (незамещенным), например 7-N-метилгуаниловая и 7-N-метилинозиновая кислоты и соответствующие нуклеозиды[48]. Интенсивность флуоресценции нуклеотидов ниже, чем для нуклеозидов. В интервале от 0 до 60° С интенсивность флуоресценции является функцией температуры, однако сдвига максимума флуоресценции в этом интервале температур не наблюдается[48].

С помощью метода импульсного фотолиза получен ряд характеристик возбужденного триплетного состояния урацила в водном растворе, в частности определено его время жизни в отсутствие тушителей (6,1 ± 0,5 *мксек*[312]).

Константы ионизации. Перераспределение электронной плотности при возбуждении оснований, нуклеозидов и нуклеотидов влияет на легкость диссоциации или присоединения протона к пуриновым и пиримидиновым ядрам, иными словами, меняет р*K* этих соединений. Энергия возбуждения нейтральных и ионизованных молекул различна, что в шкале волновых чисел может быть выражено уравнением

$$\nu_{МН} - \nu_{М} = \Delta\nu \tag{5}$$

где $\Delta\nu$ (в *см*$^{-1}$) определяется как средняя величина сдвигов в спектрах поглощения и флуоресценции при переходе от протонированной (МН) к депротонированной (М) форме соединения[8].

Разность энергий, определяемая $\Delta\nu$, характеризует разницу энтальпий ионизации в основном и возбужденном состояниях. Отсюда разность между рK в основном и возбужденном состоянии может быть вычислена по следующему уравнению:

$$pK^* - pK = -\frac{hc}{kT}\Delta\nu \qquad (6)$$

Значения $\Delta\nu$ некоторых нуклеотидов, определенные из спектров поглощения и флуоресценции, приведены в табл. 12.2.

Таблица 12.2. **Изменение энергии возбуждения при ионизации нуклеотидов**[39]

Нуклеотид	pH среды	$\Delta\nu$, $см^{-1}$	Нуклеотид	pH среды	$\Delta\nu$, $см^{-1}$
pdT	7—11	—250	pC	1—7	—250
pA	1—7	—350	pU	7—11	—60
pG	1—7	—740			
	12	—260			

Из данных табл. 12.2 и уравнения (6) следует, что при возбуждении рK повышается, т. е. протон связывается более прочно. Значения $\Delta\nu$ относительно невелики; это означает, что изменения рK, по-видимому, не очень значительны. Для сравнения можно привести $\Delta\nu$ β-нафтола, равное $+3300$ $см^{-1}$ и соответствующее сдвигу рK на 7 единиц[49].

Непосредственное сравнение величин рK и рK^* нуклеотидов подтверждает неравенство $pK < pK^*$[36, 50]; количественные данные, однако, весьма противоречивы. При расчете термодинамических параметров ионизации при комнатной температуре были использованы только данные спектров поглощения[50], а в случае применения спектров эмиссии сравнивались данные по рK для возбужденных состояний при 77° K и основного при 298° K[36], что, вероятно, неправомерно вследствие зависимости рK от температуры. Кроме того, для замороженных растворов термин рK вообще условен, так как равновесие протолитической реакции в этих условиях, по-видимому, не достигается.

Таутомерное равновесие. Имеются данные, свидетельствующие о различии в свойствах возбужденных состояний разных таутомерных форм производных пиримидинов[36]. N-Метилзамещенные пиримидины, моделирующие лактамную форму, не флуоресцируют при комнатной температуре и обнаруживают слабую флуоресценцию при 77° K. O-Метилзамещенные пиримидины, являющиеся моделью лактимной формы, напротив, сильно флуоресцируют при комнатной температуре и фосфоресцируют при 77° K[36].

Возбуждение молекулы, вызывающее перераспределение электронной плотности в гетероциклическом основании, приводит к сдвигу таутомерного равновесия. Квантовохимические расчеты показывают, что в возбужденном состоянии облегчается переход оснований в редкие лактимные (для гуанина, урацила и тимина) и иминные (для цитозина и аденина) формы [50–52]. По данным Данилова [51], в первом возбужденном синглетном состоянии аденин переходит в иминную форму легче, чем цитозин, а тимин и урацил переходят в лактимную форму легче, чем гуанин, т. е. относительная легкость перехода различных оснований в редкие таутомерные формы обратна таковой в основном состоянии.

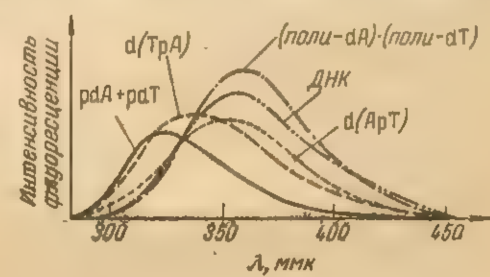


Рис. 12.3. Спектры флуоресценции моно-, олиго- и полинуклеотидов [35].

Полинуклеотиды

Нуклеотидное звено, входящее в состав полинуклеотидной цепи, принимает участие в сложном комплексе взаимодействий с соседними звеньями. В возбужденном состоянии такие взаимодействия (особенно обусловленные π-электронами) усиливаются, [35, 44]. Об этом свидетельствуют, в частности, более резкие различия в спектрах флуоресценции, чем в спектрах поглощения, при переходе от моно- к олиго- и полинуклеотидам [35, 39, 42, 44, 53–54] (рис. 12.3). С другой стороны, взаимодействие мономерных звеньев в полинуклеотидной цепи изменяет свойства возбужденных состояний полинуклеотидов. Время жизни синглетного возбужденного состояния мононуклеотидных звеньев в полинуклеотиде приблизительно в 100 раз меньше, чем для мономерных компонентов.

На основании спектров флуоресценции и ряда других фактов было высказано предположение о существовании в полинуклеотидах при низких температурах синглетных эксимеров, т. е. возбужденных аддуктов, образующихся в результате перекрывания π-электронных облаков возбужденного гетероциклического основания с соседним по цепи невозбужденным основанием [35, 54].

Для некоторых двухцепочечных полинуклеотидов характерно безызлучательное тушение возбуждения. Например, комплексы (поли-A) · (поли-U) и (поли-dG) · (поли-dC) не люминесцируют при низких температурах в отличие от составляющих их мононуклеотидов [42, 54, 57]. Однако ДНК флуоресцирует при 77° K [42].

Наконец, весьма характерным для возбужденных полинуклеотидов при низких температурах является перенос энергии возбуждения нуклеотидными звеньями [39, 44, 55, 56, 58]. Возможны синглет-синглетный и триплет-триплетный переносы. Триплет-триплетный

перенос особенно важен при изучении фотохимии полинуклеотидов. Перенос, естественно, осуществляется только в направлении уменьшения энергии возбуждения, что приводит независимо от длины волны возбуждающего излучения к заселению триплетного уровня составляющего нуклеотида с наименьшей энергией триплетного возбуждения. Это находит отражение в спектрах фосфоресценции. Например, при pH 7 спектр d(ApT) соответствует спектру pdT, поскольку значение ^3E для pdT меньше, чем для dAp. В щелочной области спектр динуклеозидмонофосфата соответствует спектру dAp, так как здесь уже величина ^3E меньше для dAp, чем для аниона pdT [35]. С этим согласуется тот факт, что при 77° К триплетное состояние ДНК соответствует триплетному состоянию pdT, как можно судить по данным спектров фосфоресценции и ЭПР [59].

Аналогично мононуклеотидам возбужденные состояния полинуклеотидов меняются при переходе от низких температур к более высоким. Большинство полинуклеотидов не люминесцирует в возбужденных состояниях при комнатной температуре. По-видимому, уменьшается время жизни возбужденного синглетного состояния, что в случае неизменности $\varphi_{икк}$ должно привести к уменьшению выхода триплетов [44]. Ди- и полинуклеотиды, содержащие остатки протонированного гуанозина, 7-N-метилгуанозина, 7-N-метилинозина или остатки 4-*экзо*-N-ацетилцитидина, флуоресцируют при возбуждении в растворах при температурах выше 0° С [47,60,311]. Интенсивность флуоресценции олиго- и полинуклеотидов почти вдвое меньше, чем для мононуклеотидов, и зависит, кроме того, от последовательности мононуклеотидов; сдвига λ_{max} флуоресценции не происходит. По-видимому, в данном случае эксимеры не образуются и синглетный перенос энергии к флуоресцирующему основанию отсутствует [48, 60]. Однако ряд данных свидетельствует о возможности переноса энергии в растворах ДНК при температурах выше 0° С [44].

Исходя из приведенных данных, можно полагать, что в возбужденных состояниях различие в реакционной способности мононуклеотидов как таковых и в составе полимера больше, чем в основном состоянии, за счет усиления межплоскостного взаимодействия и возможности переноса энергии.

Следует отметить, что большинство данных по возбужденным состояниям нуклеотидов и нуклеиновых кислот получено при низких температурах, когда влиянием природы растворителя или вязкости среды можно пренебречь. В растворах при комнатной температуре влияние растворителя и ряд других факторов могут существенно менять свойства молекулы в возбужденном состоянии и сам характер заселения возбужденных уровней. В еще большей степени это относится к биологическим системам. Поэтому, исполь-

зуя данные по возбужденным состояниям нуклеотидов при рассмотрении конкретной реакции, необходимо всегда критически оценить возможность их применения для данных конкретных условий.

2. Электронная структура оснований нуклеиновых кислот в возбужденных состояниях

Переход молекулы в возбужденное состояние характеризуется перераспределением электронной плотности, т. е. изменением электронной структуры и вследствие этого ее реакционной способности. В связи с этим представляют интерес квантовохимические расчеты электронной структуры гетероциклических оснований нуклеиновых кислот в возбужденном состоянии (об их электронной структуре в основном состоянии см. гл. 3). Такие расчеты были выполнены главным образом для пиримидинов[61–69]. Получены также некоторые данные, характеризующие триплетное состояние пуринов[52, 63, 70] и возбужденные состояния комплементарных пар оснований ДНК[71–73].

Пиримидиновые основания

Для расчетов электронных структур пиримидинов в возбужденном состоянии использовали метод молекулярных орбиталей в приближении Хюккеля и метод самосогласованного поля для открытых оболочек. Последний в отличие от метода Хюккеля позволяет различать триплетное и синглетное возбужденные состояния. Основные результаты таких квантовохимических расчетов приведены в табл. 12.3—12.5.

Анализ приведенных данных позволяет обнаружить следующие закономерности. При возбуждении резко уменьшается порядок связи С-5—С-6 при незначительном уменьшении порядка других связей. Увеличивается индекс свободной валентности[65] на атомах С-5 и С-6. Для урацила и тимина эти эффекты проявляются в большей степени, чем для цитозина. Следовательно, в возбужденном состоянии возрастает реакционная способность двойной связи С-5—С-6. Этот вывод подтверждается экспериментально (см. ниже).

Следует, однако, отметить, что, по данным Данилова[67], переход в триплетное возбужденное состояние сопровождается гораздо более сильным снижением порядка двойной связи С-5—С-6, чем переход в синглетное возбужденное состояние; в то же время, по данным Пюльмана[65], этой разницы между возбужденными синглетным и триплетным состояниями не наблюдается.

При переходе в триплетное возбужденное состояние на атомах пиримидинов возникает определенная плотность неспаренных электронов, которая может быть аппроксимирована спиновой плотностью. Наибольшая плотность неспаренных электронов сосредоточена

на атомах С-5 и С-6, что делает эти атомы наиболее реакционноспособными. По данным Данилова [67], бо́льшая часть общей электронной плотности на С-5 и С-6 пиримидинов обусловлена плотностью неспаренных электронов. Согласно Пюльману [65], спиновая плотность на С-5 и С-6 цитозина значительно меньше, чем на других атомах той же молекулы и чем на С-5 и С-6 урацила и тимина.

Таблица 12.3. **Порядки связей в молекулах пиримидиновых оснований в основном и первых возбужденных состояниях**

Основание	Состояние	Порядки связей								Литература
		N-1—C-2	N-1—C-6	C-2—N-3	C-2—2-экзо-O	N-3—C-4	C-4—C-5	C-4—4-экзо-X	C-5—C-6	
Урацил	S_0	0,365	0,479	0,376	0,811	0,371	0,387	0,799	0,819	74
		0,315	0,319	0,321	0,846	0,305	0,332	0,839	0,890	66
	S_1	0,390	0,464	0,346	0,752	0,317	0,467	0,718	0,413	65
		—	—	—	—	—	—	—	0,444	69
	T_1	0,364	0,396	0,396	0,808	0,317	0,518	0,506	0,449	65
		0,309	0,307	0,314	0,851	0,286	0,395	0,811	0,085	66
Тимин	S_0	0,325	0,293	0,319	0,843	0,308	0,333	0,836	0,903	66
	S_1	0,390	0,461	0,346	0,765	0,312	0,456	0,714	0,411	65
		0,288	0,430	0,366	0,845	0,192	0,410	0,525	0,424	66
	T_1	0,368	0,390	0,395	0,807	0,314	0,518	0,499	0,451	68
		0,305	0,310	0,320	0,851	0,269	0,449	0,778	0,106	66
Цитозин	S_0	0,375	0,529	0,433	0,778	0,636	0,525	0,470	0,758	74
		0,306	0,389	0,432	0,791	0,742	0,435	0,377	0,846	66
	S_1	0,397	0,363	0,477	0,714	0,466	0,522	0,358	0,665	65
		—	—	—	—	—	—	—	0,553	66
	T_1	0,287	0,394	0,527	0,475	0,500	0,391	0,391	0,826	65
		0,274	0,312	0,414	0,810	0,683	0,526	0,352	0,144	66

Расчеты электронной плотности, плотности неспаренных электронов на С-5 и С-6 и порядка связи С-5—С-6, проведенные для ряда замещенных пиримидинов [65, 67, 69], позволяют судить о влиянии заместителей в пиримидинах на реакционную способность С-5 и С-6 в возбужденном состоянии, и в частности на способность к димеризации под действием УФ-облучения, поскольку плотность неспаренных электронов коррелирует с легкостью фотодимеризации [65, 69]. Исключение здесь составляет азатимин. По-видимому, введение в пиримидиновое ядро третьего атома азота меняет характер возбужденного триплетного состояния [65, 69].

Таблица 12.4. **Значения электронной плотности на атомах пиримидиновых оснований в основном и первых возбужденных состояниях**

Основание	Состояние	Электронная плотность на атомах									Литература
		N-1	C-2	N-3	C-4	C-5	C-6	2-экзо-O	4-экзо-X	5-экзо-C	
Урацил	S_0	1,689	0,768	1,762	0,788	1,219	0,859	1,463	1,456		74
		—	—	—	—	1,064	0,942	—	—		67
	S_1	1,487	0,886	1,723	0,928	0,995	1,231	1,394	1,356		65
		—	—	—	—	0,796	1,038	—	—		69
	T_1	1,691	0,806	1,747	1,005	0,979	1,145	1,445	1,182		65
		—	—	—	—	0,926	1,086	—	—		67
Тимин	S_0	—	—	—	—	1,047	0,958	—	—		67
	S_1	1,511	0,870	1,739	0,959	0,972	1,231	1,368	1,409	1,021	65
		—	—	—	—	0,838	1,051	—	—		69
	T_1	1,693	0,805	1,748	1,016	0,954	1,153	1,447	1,195	1,041	65
		—	—	—	—	0,928	1,085	—	—		67
Цитозин	S_0	1,639	0,796	1,438	0,828	1,169	0,835	1,492	1,803		74
		—	—	—	—	1,090	0,901	—	—		67
	S_1	1,604	0,799	1,299	1,149	1,079	1,190	1,066	1,814		65
		—	—	—	—	0,964	1,136	—	—		69
	T_1	1,721	0,993	1,130	1,120	1,103	1,003	1,141	1,789		65
		—	—	—	—	0,924	1,102	—	—		67

Таблица 12.5. **Спиновая плотность на атомах пиримидиновых оснований в первом возбужденном триплетном состоянии** [65]

Основание	Спиновая плотность на атомах*								
	N-1	C-2	N-3	C-4	C-5	C-6	2-экзо-O	4-экзо-X	5-экзо-C
Урацил	0,147	0,005	0,074	0,295	0,412 (0,822)	0,496 (0,875)	0,012	0,556	
Тимин	0,145	0,004	0,078	0,298	0,379 (0,723)	0,497 (0,871)	0,010	0,554	0,004
Цитозин	0,147	0,299	0,333	0,339	0,044 (0,664)	0,097 (0,842)	0,605	0,135	

* В скобках приведены значения плотности неспаренных электронов [67].

По относительной способности к образованию фотодимеров при УФ-облучении замещенные пиримидины могут быть разделены на несколько групп (на четыре, табл. 12.6). Легкость фотодимеризации уменьшается в следующем порядке: соединения 1-й группы >

> соединения 2-й группы > соединения 3-й группы (в порядке расположения в табл. 12.6); соединения 4-й группы не димеризуются при облучении [65].

Таблица 12.6. **Спиновая плотность на атомах С-5 и С-6 замещенных пиримидинов**

Основание	Спиновая плотность на атомах*		Плотность неспаренных электронов на связи С-5—С-6**
	С-5	С-6	
Тимин	0,723	0,871	1,21
Урацил	0,822	0,875	1,25
6-Метилурацил	0,820	0,802	1,21
Оротовая кислота	0,787	0,811	1,12
Изоцитозин	0,169	0,722	1,16
5-Аминоурацил	0,616	0,864	1,05
5-Метилцитозин	0,561	0,837	0,88
Цитозин	0,664	0,842	0,86
2-Тиотимин	0,254	0,768	0,71
5-Нитроурацил	0,000	0,019	—
6-Азатимин	0,735	0,778	1,14

* По данным 69.
** По данным 64.

Таким образом, результаты квантовохимических расчетов свидетельствуют о том, что пиримидины в возбужденном состоянии должны подвергаться атаке по двойной связи С-5—С-6 значительно легче, чем в основном состоянии. Реакционная способность пиримидинов в синглетном и триплетном возбужденных состояниях, по-видимому, неодинакова.

Пуриновые основания

Величины спиновой плотности на скелетных атомах аденина I и гуанина II в возбужденном триплетном состоянии [52] приведены ниже:

0,206 NH_2; 0,337; 0,274 N; N 0,109; 0,112; 0,363; 0,165; 0,075; N 0,290; N 0,069; H

I

0,640 O; 0,414; 0,036 N; HN 0,151; 0,195; 0,066; 0,115; 0,237; H_2N 0,028; N 0,091; N 0,028; H

II

Из данных квантовохимических расчетов следует, что плотность неспаренных электронов на атомах молекулы аденина I падает в ряду

C-8 > N-3 > N-7 > N-1

а для гуанина II в ряду

N-1 > N-3 > C-8 > N-7

При этом в аденине спиновая плотность на атомах имидазольного ядра и на N-3 значительно выше, чем в гуанине. Имеющиеся данные недостаточны для сравнения реакционной способности пуринов в основном и возбужденном состояниях.

V. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

1. Фотореакции пиримидиновых производных

Урацил и его производные

В настоящее время для урацила и его производных известно два основных типа фотохимических реакций: присоединение по двойной связи С-5—С-6 и димеризация.

УФ-Излучение индуцирует присоединение к урацилу и его производным воды [75,76], спиртов [2,77,78], синильной кислоты [79]. Это согласуется с результатами квантовохимических расчетов, из которых следует, что при возбуждении урацила УФ-облучением повышается реакционная способность двойной связи С-5—С-6, причем электронная плотность на атоме С-6 слегка увеличивается, а на С-5 уменьшается (см. стр. 629). Отсюда становится понятным тот факт, что урацил, двойная связь которого в основном состоянии способна к присоединению лишь сильных нуклеофильных агентов (см. стр. 342), в возбужденном состоянии реагирует даже с такими слабыми нуклеофилами, как вода.

Возбуждение облегчает также поляризацию двойной связи С-5—С-6 под действием электронодонорных или электроноакцепторных заместителей; в возбужденном урациле эта связь до некоторой степени сравнима с алифатической двойной связью, сопряженной с электроноакцепторной группой (например, как в α, β-ненасыщенных кетонах) [80].

Фотогидратация. Наиболее изученной фотореакцией урацила является гидратация. При облучении водного раствора урацила III ($R = R' = H$) происходит присоединение воды и образуется

фотогидрат. Рядом методов было доказано [81–86], что фотогидрат является 6-окси-5,6-дигидроурацилом IV ($R = R' = H$):

$$\text{III} \xrightarrow{H_2O(h\nu)} \text{IV}$$

Аналогично реагируют с водой производные урацила [2], в частности 1-метилурацил III ($R = CH_3$, $R' = H$) [87], 1,3-диметилурацил III ($R = R' = CH_3$) [81], уридин III (R — остаток рибозы, $R' = H$) [88] и уридиловые кислоты III (R — остаток рибозофосфата, $R' = H$) [89].

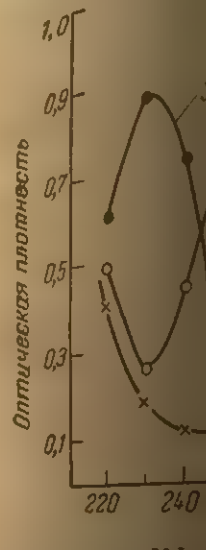
Для ряда гликозидных производных урацила (уридина [83], дезоксиуридина [313] и уридин-5′-фосфата [85]) показано образование по крайней мере двух диастереоизомерных фотогидратов, которые в случае дезоксиуридина были выделены в соотношении 7 : 3 и охарактеризованы [313].

Свойства фотогидратов. Фотогидраты производных урацила не обладают поглощением в области 260 *ммк* (рис. 12.4), что объясняется насыщением двойной связи С-5—С-6. Анион фотогидрата урацила по 4-оксигруппе, крайне нестойкий в щелочной среде, имеет максимум поглощения в области 240 *ммк* за счет сопряжения [94]:

$$O{=}\overset{2}{C}{-}\overset{3}{N}{=}\overset{4}{C}{-}O^-$$

Фотогидраты производных урацила относительно стабильны в нейтральных растворах при комнатной температуре. При подкислении, подщелачивании или нагревании происходит отщепление элементов воды с образованием исходного урацила или соответствующего его производного [77] (рис. 12.5).

Диастереоизомерные фотогидраты обладают различной устойчивостью и в кислой, и в щелочной среде. Так, в 1 н. соляной кислоте [311] один из изомеров фотогидрата дезоксиуридина (получающийся при данных условиях в меньших количествах) непосредственно не дегидратируется, а лишь изомеризуется в другой изомер. Последний легко отщепляет воду, превращаясь в исходный дезоксиуридин с константой скорости $7{,}8 \cdot 10^{-4}$ *сек*$^{-1}$. Напротив, в щелочной среде первый изомер лабильнее второго. Дегидратация двух изомеров в этом случае протекает по разным механизмам [313]. Изомер II отщепляет молекулу воды, образуя непосредственно исходный дезоксиуридин. Превращение изомера I в дезоксиуридин протекает через промежуточный продукт, по-видимому, с расщепле-



нием и последующим замыканием связи N-1—C-6[313] (ср. также[94, 96]).

Скорость дегидратации фотогидратов уридиловых кислот при нагревании в слабощелочной среде зависит от положения фосфатной группы, понижаясь в ряду Urd > U(2′)p > pU > Up(3′). Рассмотрение молекулярных моделей приводит к предположению[95],

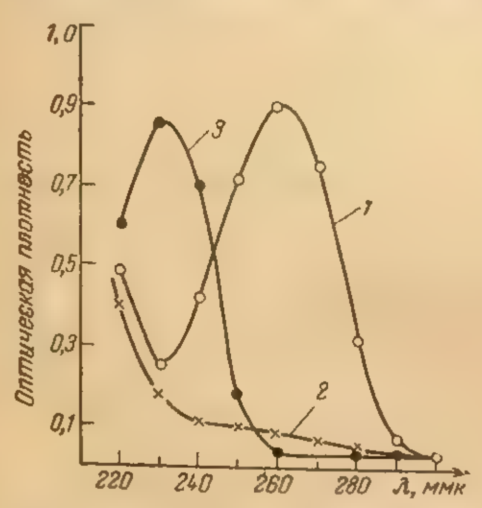


Рис. 12.4. УФ-спектры поглощения уридина (кривая 1) и фотогидрата уридина (кривая 2) в нейтральной среде и аниона фотогидрата уридила при pH 12 (кривая 3)[94].

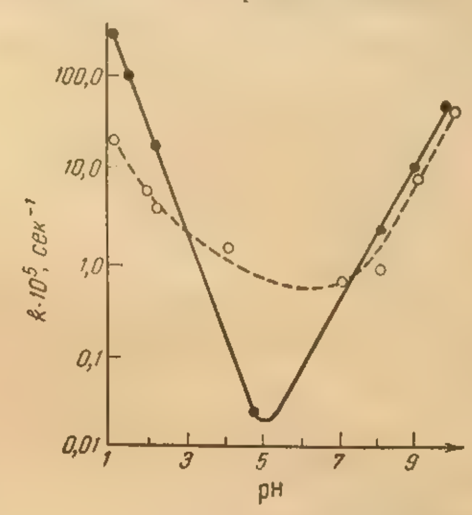


Рис. 12.5. Регенерация производных урацила из соответствующих фотогидратов. Зависимость константы скорости регенерации урацила (пунктирная кривая) и 1,3-диметилурацила (сплошная кривая) от pH[77].

что фосфатные группы в положениях 2′ или 5′ должны сильнее взаимодействовать с урацильным ядром, чем в положении 3′, однако строгих экспериментальных подтверждений этого эффекта пока нет.

Механизм реакции. Ряд фактов, и в частности отсутствие влияния кислорода на скорость образования фотогидрата[90], позволили предположить, что в реакцию фотогидратации вступает урацил, находящийся в первом возбужденном синглетном состоянии[45, 91–93]. Квантовый выход[93] и величина константы скорости образования фотогидрата урацила[92] возрастают с уменьшением pH (рис. 12.6 и 12.7).

При изучении зависимости скорости образования фотогидрата урацила от pH обнаружен специфический анионный эффект, согласующийся с гипотезой ионного фотопроцесса[91]. На этом основании был предложен механизм фотогидратации, включающий в качестве первой стадии протонирование урацила, находящегося в первом синглетном возбужденном состоянии, с последующим присоединением воды[92]. Место присоединения протона строго не

установлено. Быстрый обмен водорода при С-5 при проведении реакции в D_2O * позволил предположить следующий механизм фотогидратации [83]:

$$\text{урацил} \xrightarrow{h\nu} [\;]^{*} \xrightarrow{D_2O} [\;] \longrightarrow \text{(5-D, 6-DO)}$$

Указанный механизм возможен, по-видимому, и для 1-метилурацила, который обнаруживает аналогичную урацилу зависимость скорости реакции от pH.

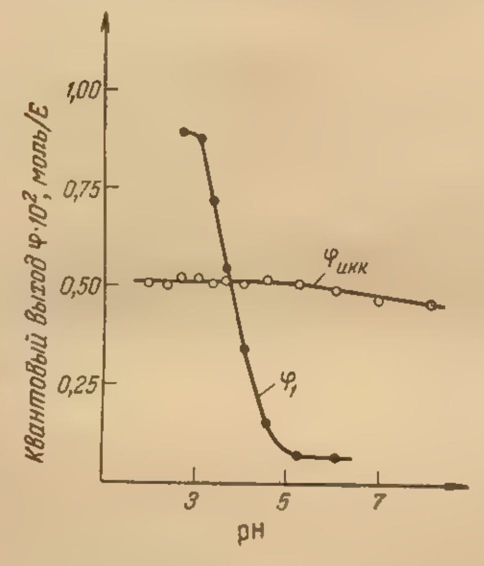


Рис. 12.6. УФ-Облучение (265 *ммк*) урацила в атмосфере азота. Зависимость квантовых выходов фотогидратации φ_1 и интеркомбинационной конверсии $\varphi_{икк}$ от pH [93].

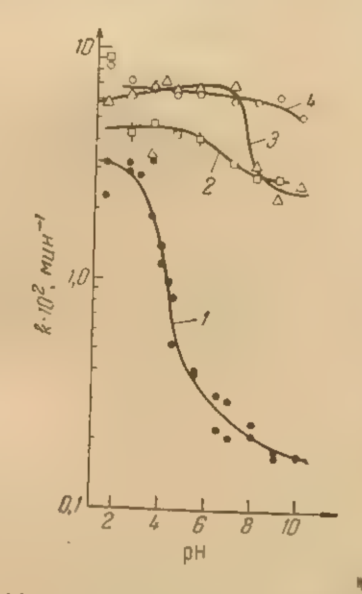


Рис. 12.7. Гидратация производных урацила при УФ-облучении. Зависимость константы скорости реакции от pH [92]:

1 — фотогидратация урацила; *2* — 1-этоксиурацила; *3* — 1-циклогексилурацила; *4* — уридина.

Однако для уридина и 1,3-диметилурацила механизм фотогидратации, по-видимому, иной, поскольку в случае уридина константа скорости реакции слабо зависит от pH [92] (см. рис. 12.7), а константа скорости фотогидратации 1,3-диметилурацила не зависит от pH и на порядок превышает соответствующую константу для ура-

* Следует отметить, что скорость гидратации урацильных ядер РНК в H_2O больше, чем в D_2O; изотопный эффект, по данным [352], составляет 2,2.

цила. Кроме того, в случае фотогидратации 1,3-диметилурацила специфический анионный эффект отсутствует [91].

Присоединение HCN. При УФ-облучении урацила и уридина в нейтральных водных растворах синильной кислоты (0,01—0,05 *M*) поглощение при 260 *ммк* падает значительно быстрее, чем при облучении в воде. Состав и структура продуктов реакции не установлены, однако показано, что они содержат урацильное ядро с насыщенной связью С-5—С-6 и цианогруппу [79]. Эти данные позволяют считать, что под действием УФ-облучения HCN, подобно воде, присоединяется по двойной связи С-5—С-6 урацильного ядра [79].

По данным [314], начальные стадии фотореакции урацила с HCN при pH 7 могут быть выражены схемой

Расчеты, основанные на изменениях спектров урацила в процессе реакции, показали, что скорость реакции урацила с HCN на три порядка превышает скорость фотогидратации; это согласуется с большей нуклеофильной активностью HCN по сравнению с водой [79].

Присоединение спиртов. Имеется ряд данных, свидетельствующих о том, что при облучении урацила и 1,3-диметилурацила в спиртах последние, подобно воде, обратимо присоединяются по двойной связи С-5—С-6 [77, 97, 98]. Более подробно реакция присоединения спиртов исследована на примере взаимодействия 5-фтор-1,3-диметилурацила V с метанолом при УФ-облучении ($\lambda > 270$ *ммк*) [78]. При этом образуется 5-фтор-6-метокси-1,3-диметил-5,6-дигидроурацил VI.

Соединение VI в кислой и щелочной среде регенерирует исходный продукт, а при облучении более коротковолновым УФ-излуче-

нием (254 *ммк*), подобно фотогидрату 5-фтор-1,3-диметилурацила, отщепляет элементы HF, давая 6-метокси-1,3-диметилурацил VII.

Для урацила и его производных известно, кроме перечисленных, несколько реакций фотоиндуцированного присоединения по двойной связи С-5—С-6, не относящихся, по-видимому, к типу нуклеофильных.

Фотовосстановление. При облучении (253,7 *ммк*) водного раствора уридина в присутствии боргидрида натрия образуется 5,6-дигидроуридин[99, 100]. Для уменьшения побочной реакции — гидратации уридина — фотовосстановление проводят при повышенной температуре (50° С). Оптимальным для реакции является pH среды 9,5—10. Механизм фотовосстановления уридина детально не исследовался. В случае тимидина показано, что при фотовосстановлении водород из натрийборгидрида (в виде H^- или атомарного водорода) присоединяется к атому С-5, а к С-6 присоединяется водород из растворителя[100]. Однако не исключено, что для уридина механизм фотовосстановления иной, поскольку реакция может идти через разные возбужденные состояния.

При длительном воздействии $NaBH_4$ (при облучении или в темноте) происходит вторичная реакция — восстановительное расщепление связи N-3—С-4 в молекуле дигидроуридина с образованием рибозильного производного γ-оксипропилмочевины. Фотогидрат уридина в результате темновой реакции с $NaBH_4$ образует *D*-рибозилмочевину[34].

R — остаток рибозы

В определенных условиях фотовосстановление является достаточно специфической реакцией и, по-видимому, может быть применено для специфической модификации звеньев уридина в составе РНК[100]. Однако следует учесть образование при облучении РНК других первичных фотопродуктов и то, что фотогидрат цитидина также вступает в темновую реакцию с $NaBH_4$[84]. В условиях фотовосстановления урацила или его 1-N-замещенных 3-N-метилированные производные урацила практически устойчивы. При более длительном облучении в присутствии натрийборгидрида 1,3-диметилурацил восстанавливается до 1,3-диметил-5,6-дигидроурацила, который в результате темновой реакции с $NaBH_4$ дает γ-замещенный

пропанол VIII и продукт[315], имеющий, по данным ЯМР-, ИК- и масс-спектров, строение IX:

VIII IX

Фотодимер урацила нециклобутанового типа (см. стр. 639), возможно, имеет структуру, сходную с IX.

Присоединение цистеина и других аминокислот. При облучении (253,7 *ммк*) водного раствора урацила в присутствии избытка гидрохлорида цистеина 25% урацила превращается в 5-S-цистеинил-5,6-дигидроурацил X[101] (строение доказано с помощью ЯМР-спектроскопии).

X

Продукт присоединения X устойчив к нагреванию (100° С, 15 *мин*) и к действию кислот (6 н. соляная кислота), но расщепляется при обработке 0,1 н. раствором NaOH. ^{35}S-Цистеин включается при облучении в поли-U и РНК, в меньшей степени — в поли-С, поли-dT и ДНК. Включение резко уменьшается в случае двухспиральных полинуклеотидов. Урацил при облучении (253,7 *ммк*) способен также связываться с глицином, серином, фенилаланином, тирозином, триптофаном, цистином, метионином, гистидином, аргинином и лизином. Наибольший процент связывания обнаружен для цистеина, тирозина и фенилаланина[316]. Характер связи (за исключением цистеина) не установлен.

Предполагается, что реакции такого типа моделируют возможные пути образования сшивок между белками и полинуклеотидами в нуклеопротеидах [102, 316–318].

Фотодимеризация. Наряду с присоединением воды УФ-облучение урацила приводит к реакции иного типа — присоединению второй молекулы пиримидина с образованием димера [103, 104], который, как было показано позднее, имеет циклобутановую структуру XI [2, 105]:

XI

Аналогичные димеры образуют при облучении уридин [90, 106], уридиловые кислоты [107], динуклеозидмонофосфаты уридина [12, 108] и уридин в составе поли-U [109, 110] и РНК [107]. При облучении замороженных растворов урацила и его производных [98, 103, 104, 111] фотодимеризация является основной реакцией.

Структура фотодимеров. Фотодимер урацила XI может иметь одну из четырех стереоизомерных структур XIа—XIг [105]:

XIа

XIб

XIв

XIг

При облучении замороженных растворов урацила[98, 105] образуется изомер со структурой XIa; аналогичные данные получены и для уридина[106]. Есть указания на то, что при продолжительном стоянии оттаявшего водного раствора димера урацила он частично переходит в другой изомер[112]. Облучение урацила в водном растворе приводит к образованию нескольких изомерных димеров[90], один из которых идентичен димеру, полученному из замороженного раствора[45]. Фотодимеризация (облучение при 265 *ммк*) урацильных ядер в динуклеозидмонофосфате UpU приводит к образованию * трех изомеров $\overline{UpU}^1$, $\overline{UpU}^2$ и $\overline{UpU}^3$ в соотношении 6 : 2 : 1[12]. По-видимому, $\overline{UpU}^1$ имеет структуру типа XIa. При облучении d(UpU) выделено два изомера, аналогичных по свойствам $\overline{UpU}^1$ и $\overline{UpU}^2$, в соотношении 5 : 1[108]. Большинство димерных фрагментов, образующихся при облучении поли-U, обладают характеристиками $\overline{UpU}^1$, т. е., вероятно, соответствуют структуре типа XIa. Структуры $\overline{UpU}^2$ и $\overline{UpU}^3$ не идентифицированы.

При облучении урацила в замороженном водном растворе кроме циклобутанового димера XIa был выделен фотопродукт, не обладающий циклобутановой структурой, которому на основании ЯМР-, УФ- и ИК-спектров была приписана структура

а также фотопродукт, являющийся, по-видимому, тримером урацила[319].

Свойства фотодимеров. Насыщение двойной связи С-5—С-6 при образовании фотодимера приводит, как и в случае фотогидрата, к исчезновению максимума поглощения в области 260 *ммк*. Анион фотодимера обнаруживает максимум поглощения в области 235 *ммк* (рис. 12.8), что вызвано образованием хромофора

$$O{=}\overset{2}{\underset{|}{C}}{-}\overset{3}{N}{=}\overset{4}{\underset{|}{C}}{-}O^-$$

* Здесь и далее горизонтальная скобка над символами — обозначение фотодимера: например, $\overline{UpU}$ — фотодимер, образуемый урацильными ядрами одной молекулы уридилил-(3'→5')-уридина. Цифровые индексы вверху справа обозначают фотодимеры с различными (в данном случае изомерными) структурами.

В отличие от фотогидрата фотодимер урацила стабилен в кислой среде, относительно стабилен в разбавленной щелочи при комнатной температуре и быстро деградирует при повышенной температуре. Фотодимер уридилил-(3'→5')-уридина $\overline{UpU}$ при pH 9,3 претерпевает обратимое расщепление одного из урацильных ядер, по-видимому, по связи N-3—C-4 [12]. Фотодимеры уридиловых кислот при обработке 1 н. раствором NaOH при 37° C [107] деградируют за 18 *ч* на 30—40%.

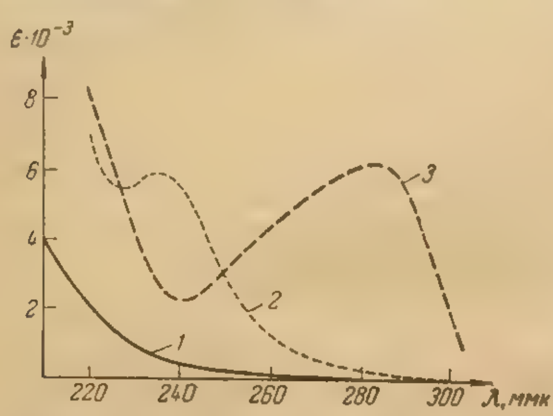


Рис. 12.8. Спектры поглощения фотодимера урацила при pH 7 (кривая *1*) и при pH 13 (кривая *2*), а также продукта, полученного облучением фотодимера (2537 A), при pH 13 (кривая *3*) [108].

Важнейшим свойством фотодимеров является фотолабильность. Облучение водных растворов фотодимеров приводит к их расщеплению и образованию исходного мономера [76, 103, 104, 109]. Фотодимеризация в растворе является, таким образом, обратимой реакцией. Равновесие между образованием мономеров и фотодимеров, которое устанавливается при длительном облучении соединений, зависит от длины волны применяемого света и сдвигается в сторону мономеров при ее уменьшении [76, 103, 104, 109].

Механизм фотодимеризации. Присутствие кислорода в водном растворе при фотодимеризации урацила, а также ряда его замещенных (уридина, уридиловых кислот) снижает выход соответствующего димера [90, 113—115]. Аналогичный эффект наблюдается при фотодимеризации урацила в ацетонитриле в присутствии изопрена [45]. Кислород и изопрен являются, как известно, тушителями триплетного состояния, и поэтому приведенные факты являются доводом в пользу того, что фотодимеризация протекает через нижнее возбужденное триплетное состояние [93]. Это же подтверждается и данными, полученными с помощью импульсного фотолиза водных растворов урацила [312]. Другим, правда косвенным, доводом в пользу этого положения является проведение фотодимеризации урацила с помощью фотосенсибилизации [116] (известно, что при фотосенсибилизации возбуждается триплетное состояние).

При обычной фотореакции заселение триплетного возбужденного состояния достигается за счет интеркомбинационной конверсии. Исходя из предположения, что фотодимеризация урацила в водном растворе идет через триплетное состояние, по выходу фотодимера был определен квантовый выход интеркомбинационной конверсии $\varphi_{икк}$ и время жизни возбужденного триплетного состоя-

ния, оказавшееся равным примерно 10^{-5} *сек* [93]. Величина $\varphi_{икк}$ практически не зависит от pH и увеличивается с уменьшением длины волны, т. е. с ростом энергии облучения (рис. 12.9). Последний факт может быть объяснен, если предположить, что интеркомбинационная конверсия происходит с высших колебательных уровней возбужденного синглетного состояния урацила [93].

Как уже указывалось выше, характер возбужденного состояния, через которое протекает фотореакция полинуклеотидов, может быть различным в зависимости от целого ряда факторов, влияющих на электронное распределение: влияния заместителей, степени полимерности полинуклеотида, наличия и характера высших структур и т. д. Анализ кинетических данных показывает, что фотодимеры $\overline{UpU}^2$ и $\overline{UpU}^3$ образуются, по-видимому, только через триплетное состояние, а $\overline{UpU}^1$ и димерные фрагменты в поли-U — и через триплетное, и через синглетное состояния [93]. Димеризация оротовой кислоты протекает, по-видимому, через триплетное состояние [113, 115, 117, 118, 320].

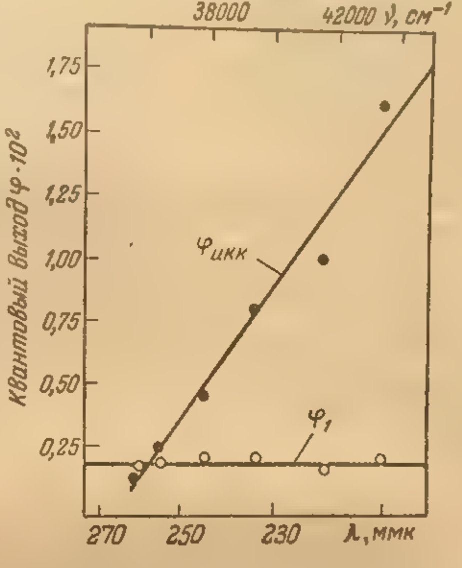


Рис. 12.9. УФ-Облучение урацила в водном растворе. Зависимость квантовых выходов гидратации φ_1 и интеркомбинационной конверсии $\varphi_{икк}$ от энергии облучения [93].

На димеризацию 1,3-диметилурацила присутствие кислорода не оказывает влияния [90], однако более подробных сведений о характере возбужденного состояния в этом случае нет.

Соотношение процессов фотогидратации и фотодимеризации. Из сказанного выше вытекает, что под действием УФ-облучения урацил и его производные в водных растворах могут реагировать по двум направлениям: с образованием фотогидрата и фотодимера. Относительный выход обоих продуктов фотолиза зависит от условий облучения (агрегатное состояние соединения, его концентрация, температура, длина волны и величина дозы облучения) и от структуры исходного производного урацила, т. е. от наличия заместителей в урацильном ядре.

В замороженных растворах при низких дозах облучения основными продуктами реакции являются фотодимеры [104]. Легкость образования димеров в замороженных растворах позволяет предположить существование в этих условиях агрегатов молекул пиримидиновых производных с определенной ориентацией оснований

относительно друг друга, облегчающей фотодимеризацию [98]. Так, урацил в замороженном водном растворе при дозе облучения $5{,}4 \cdot 10^4$ *эрг/мм*^{2} образует почти исключительно фотодимер; увеличение дозы до $8{,}6 \cdot 10^5$ *эрг/мм*^{2} приводит к преимущественному образованию фотогидрата [104].

При облучении разбавленных водных растворов урацила (10^{-4} *М*) основным продуктом фотолиза является фотогидрат. Уридин и уридиловая кислота образуют практически только фотогидрат, оротовая кислота — только фотодимер. Увеличение концентрации соединения, применение более длинноволнового излучения (270—280 *ммк*) и удаление из раствора кислорода повышают выход фотодимера. Увеличение длины волны не сказывается на выходе фотогидрата, поскольку квантовый выход гидратации не зависит от λ (см. рис. 12.9), однако увеличивает выход фотодимера, так как при этом уменьшается его расщепление на мономерные компоненты. Ингибирующее влияние кислорода на выход фотодимеров производных урацила иллюстрируется данными, представленными в табл. 12.7. В присутствии кислорода повышается относительный выход фотогидрата (см. также [90]).

Таблица 12.7. **Фотогидратация и фотодимеризация производных урацила при pH 4,4** [90]

Степень потери поглощения в области λ_{max} соединения определяет суммарный выход его фотогидрата и фотодимера, степень возврата поглощения в области λ_{max} после повторного облучения при 235 *ммк* — выход фотодимера

Соединение	Доза при 265 *ммк*, *мкЕ/см*^{2}	Степень потери поглощения в области λ_{max}, %		Степень возврата поглощения в области λ_{max} после повторного облучения при 235 *ммк*, %	
		в азоте	в присутствии кислорода	в азоте	в присутствии кислорода
Урацил	20	69	64	29	2
Уридин	2	54	48	2	0
Уридин-5′-фосфат	6	95	95	2	0
Уридин-2′ (3′)-фосфат	2	64	61	2	0
Дезоксиуридин-5′-фосфат	2	60	58	3	1
Оротовая кислота	10	54	16	39	5
1,3-Диметилурацил	12	92	92	2	1,5
Уридилил-(3′→5′)-уридин	1	50	50	9,5	7,5

Фотолиз олиго- и полинуклеотидов. Как указывалось выше, близкое расположение и соответствующая ориентация относительно друг друга пиримидиновых оснований в составе олиго- и полинуклеотидов облегчают образование фотодимеров. В то время как уридиловая кислота в разбавленных водных растворах дает прак-

тически только фотогидрат, облучение водных растворов динуклеотидов или динуклеозидмонофосфатов приводит к образованию как фотогидратов, так и фотодимеров [12, 108].

Выход фотодимеров в случае олиго- и полинуклеотидов в несколько десятков раз ниже, чем в замороженных растворах мономерных компонентов, но значительно выше, чем в водных растворах мономеров.

Квантовый выход фотодимеров и фотогидратов олигомеров зависит от длины волны облучения, как это видно из рис. 12.10. При поглощении фотона при 275 *ммк* вероятность образования фотогидрата в 2 раза больше, чем фотодимера d(͡UpU)[1], а при 240 *ммк* вероятность образования фотогидрата в 2 раза меньше, чем этого фотодимера. При данной длине волны количество образующихся фотопродуктов зависит от дозы облучения. Вследствие фотолабильности фотодимеров их количество при достаточно высоких дозах облучения уменьшается. При высоких дозах облучения фотогидраты являются преобладающими продуктами при всех длинах волн.

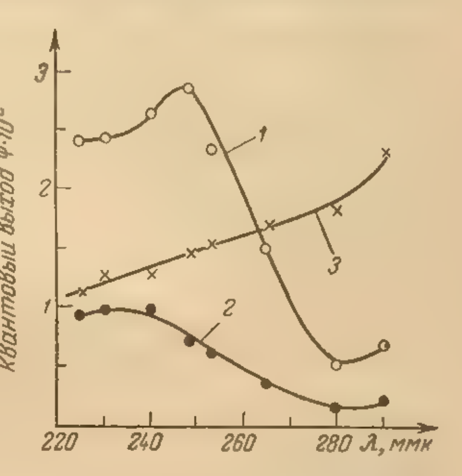


Рис. 12.10. УФ-Облучение d(UpU). Зависимость квантового выхода фотодимеров и фотогидратов от длины волны излучения [108]:

1 — для d(͡UpU)[1] (H_2O); *2* — d(͡UpU)[2]; *3* — d(UpU).

Присоединение воды по двойной связи С-5—С-6 урацильного ядра или димеризация урацильных звеньев влияют на способность соседней (3′→5′)-фосфодиэфирной связи расщепляться под действием нуклеаз. В фотогидратах, получаемых из UpU, расщепление идет с меньшей скоростью, чем в исходном соединении, а в фотодимерах ͡UpU фосфодиэфирная связь под действием нуклеаз [119] вовсе не расщепляется.

Специфический гидролиз панкреатической рибонуклеазой был использован при изучении фотолиза полиуридиловой кислоты [7, 119]. При облучении полимера часть урацильных звеньев, входящих в его состав, димеризуется и гидратируется. Расщепление панкреатической РНК-азой полученного полинуклеотида идет по схеме

$$\cdots pUp\,\overline{Up\,Up}\,Up\,\overset{H_2O}{Up}\,\overline{Up\,Up}\,Up\,Up\,\overline{Up\,Up}\,\overset{H_2O}{Up}\,\overset{H_2O}{Up}\,\overline{Up\,Up}\,\overset{H_2O}{Up}\,Up\cdots$$

Общие скорости образования димерных фрагментов и фотогидратных звеньев в поли-U близки к соответствующим величинам

для UpU. Скорость образования последовательностей $\overline{\text{UpUpUp}}$ в 3 раза меньше, чем общая скорость образования димерных фрагментов; при малых дозах облучения относительное количество последовательностей $\overline{\text{UpUp}}\overset{H_2O}{\text{Up}}$ невелико. Это свидетельствует о том, что в цепи поли-U легче всего димеризуются урацильные ядра, находящиеся рядом с уже образовавшимися димерными фрагментами. Гидратация урацильного ядра также облегчает димеризацию соседних звеньев. Относительно легкости гидратации ядра, соседнего с гидратированным, в настоящее время сведений нет. Возможно, что механизм фотолиза полиуридиловой кислоты включает передачу энергии вдоль полинуклеотидной цепи.

Таким образом, в полиуридиловой кислоте, подвергнутой УФ-облучению, фотопродукты распределены не статистически, а сосредоточены в виде групп.

Наличие двухцепочечной вторичной структуры существенно влияет на ход фотолиза, причем в разной степени на образование фотогидратов и фотодимеров. Скорость образования гидратных звеньев в комплексе (поли-А) · (поли-U) в 10 раз меньше, а димерных фрагментов в 5 раз меньше, чем в поли-U. Относительное содержание последовательностей $\overline{\text{UpUp}}\overset{H_2O}{\text{Up}}$ превышает величину, рассчитанную исходя из предположения, что положение последующих модификаций в цепи не зависит от положения предыдущих. По-видимому, фотогидратные звенья возникают в полимерной цепи гораздо скорее рядом с уже образовавшимися димерными фрагментами, чем с интактными урацильными ядрами [7, 120, 121]. На основании этих данных предложен механизм фотолиза двухцепочечного комплекса, согласно которому образование димерного фрагмента приводит к локальному плавлению двойной спирали в данной области, что облегчает фотогидратацию соседних звеньев при последующем облучении [7].

5-Галоидурацилы

Нуклеиновые кислоты, содержащие остатки 5-галоидурацилов, гораздо более чувствительны к УФ-облучению, чем обычные полинуклеотиды [122–125]. Это объясняется существенными различиями в фотохимическом поведении урацила и его галоидпроизводных вследствие значительного изменения электронной структуры урацильного ядра при введении сильного электроотрицательного галоидного заместителя [126]. Следует отметить сложность и относительно меньшую изученность фотохимии галоидпроизводных урацила. В настоящее время можно привести лишь основные закономерности их фотохимического поведения.

5-Галоидурацилы не образуют фотогидратов (за исключением фторурацила) и димеров циклобутанового типа. Основные процессы, протекающие при их облучении, имеют радикальный характер.

5-Фторурацил XII (R = R′ = H), 5-фтор-1,3-диметилурацил XII (R=R′=CH_3) и 5-фторуридин XII (R-остаток рибозы, R=H), подобно урацилу, при облучении в нейтральной среде присоединяют воду, давая соответствующий фотогидрат XIII. Однако эта реакция в отличие от урацила протекает только при длинноволновом УФ-облучении ($\lambda > 270$ *ммк*). Под действием коротковолнового ($\lambda < 270$ *ммк*) излучения фотогидраты производных фторурацила отщепляют HF, образуя производные барбитуровой кислоты XIV. Дальнейшее облучение приводит к неидентифицированным соединениям.

XII $\xrightarrow{H_2O}$ XIII ⟶

⟶ XIV ⟶ **Продукты неизвестного строения**

При фотолизе водных нейтральных или кислых растворов 5-бромурацила XV (R = R′ = H) и 5-бром-1,3-диметилурацила XV (R = R′ = CH_3) одним из основных первичных фотопроцессов является отщепление брома и образование радикала XVI:

XV ⟶ XVI

Методом импульсного фотолиза показано, что этот процесс протекает при поглощении УФ-излучения в области ниже 240 *ммк*

Образование радикала типа XVI подтверждается тем, что среди продуктов, полученных при облучении водного раствора 5-бромурацила, был обнаружен 5,5′-диурацил XVII (R = R′ = H), образование которого легко представить рекомбинацией радикалов XVI. Основным продуктом фотолиза 5-бромурацила в воде является урацил [127], образующийся, по-видимому, в результате взаимодействия радикала XVI с донором водорода, однако 5-оксиурацила обнаружено не было, так что, вероятно, XVI не реагирует с водой [127]. Кроме того, обнаружен ряд продуктов расщепления урацильного ядра.

Аналогично протекает фотолиз водного раствора 5-бром-1,3-диметилурацила XV (R = R′ = CH_3).

HOOC ... ← $+CO_2$ — XVI → XVII

XVI ↓

Методом импульсного фотолиза показано, что при УФ-облучении щелочных растворов 5-бромурацила (pH 10,5) происходит отрыв электрона от аниона 2-оксисоединения и образование радикала XVIII [131]:

→ XVIII

Происходит ли в данном случае отщепление брома и образование радикала типа XVI, строго не показано.

Звенья 5-бромурацила в составе ДНК подвергаются фотолизу при 254 *ммк* значительно быстрее, чем сам 5-бромурацил в водном или замороженном растворе [132]. Возможно, это объясняется переносом энергии, поскольку энергия триплетного возбуждения 5-бромурацила [133] ниже, чем для других оснований.

Предварительные данные, полученные с помощью метода импульсного фотолиза для 5-иодурацила, свидетельствуют о том, что одним из первичных процессов фотолиза водного раствора этого соединения является, как и в случае 5-бромпроизводного, отщепление иода с образованием радикала типа XVI [131]. Одним из продуктов, полученных при УФ-облучении водного раствора 5-иодурацила, является урацил [129]; основная масса фотопродуктов не идентифицирована. Предположение об образовании аллоксановой кислоты [129] недостаточно обосновано (ср. [127]). В присутствии меркаптоэтанола, цистеамина или в 99%-ном этаноле урацил становится главным продуктом фотолиза 5-иодурацила [130]. При УФ-облучении водного раствора 5-иодурацила в присутствии 0,01 *М* цистеамина образуется фотопродукт, который предварительно был идентифицирован как тиоэфир S-(урацилил-5)-цистеамин [130] (ср. стр. 637).

Облучение 5-иодурацила в области перехода $S_0 \rightarrow T_1$ (~ 380 *ммк*) в диметилсульфоксиде приводит к выделению свободного иода, что свидетельствует о нестабильности 5-иодурацила в триплетном состоянии [133].

4-Тиоуридин

При облучении водного раствора 4-тиоуридина в области максимума поглощения ($\lambda_{max} = 331$ *ммк*) образуется смесь продуктов, содержащая, в частности [321], продукт присоединения воды по двойной связи С-5—С-6. То обстоятельство, что 4-тиоуридин поглощает в более длинноволновой области по сравнению с обычными нуклеозидами, позволяет избирательно модифицировать звенья 4-тиоуридина в составе тРНК. При облучении при 335 *ммк* валиновой тРНК$_1$ в какодилатном буфере (pH 7) звено 4-тиоуридина в положении 8 с 5′-конца цепи полинуклеотида избирательно возбуждается и реагирует с пространственно близко расположенным звеном цитидина в положении 13; квантовый выход этой реакции составляет $5 \cdot 10^{-3}$ *моль/E*. На основании незначительных изменений УФ-спектра звена 4-тиоуридина предполагается [322], что фотореакция затрагивает атом N-3 или атомы С-5 и С-6. Такая фотореакция приводит к локальному изменению конформации молекулы тРНК, при этом тРНК сохраняет способность к аминоацилированию. При облучении в аналогичных условиях смеси мономерных 4-тиоуридина и цитидина или гидролизата тРНК указанный продукт взаимодействия не образуется.

При облучении 4-тиоуридина в *трет*-бутаноле в присутствии воздуха происходит окисление тиогруппы; образующийся продукт далее превращается в результате гидролиза в уридин. В отсутствие кислорода эта реакция не идет. Облучение тиоуридина в присутствии кислорода и аммиака приводит к образованию смеси уридина и цитидина [321]. Аналогично реагирует 4-тиоуридин в составе неструктурированной тРНК при облучении *трет*-бутанольного раствора триметилгексадециламмониевой соли тРНК из *E. coli* [321].

Псевдоуридин и его производные

Поскольку в молекуле псевдоуридина остаток рибозы присоединен к атому С-5 пиримидинового кольца, фотохимическое поведение псевдоуридина резко отлично от поведения других производных уридина. Фотолиз псевдоуридина в водном растворе необратим, по-видимому, вследствие частичной деградации пиримидинового ядра [323]. Характер фотолиза псевдоуридиловых кислот зависит от положения фосфатной группы. При облучении псевдоуридин-3′-фосфата в продуктах реакции обнаружен неорганический фосфат, 5-формилурацил и неидентифицированное соединение, не содержащее фосфора, но сохраняющее, вероятно, пиримидиновое ядро. Псевдоуридин, его 2′-фосфат и 2′,3′-циклофосфат не образуют при облучении указанных соединений [324]. Облучение тРНК или олигонуклеотидов, содержащих звенья псевдоуридина, сопровождается деградацией полинуклеотидной цепи [324, 325].

6-Азаурацил

6-Азаурацил приблизительно втрое устойчивее урацила к действию УФ-облучения в стандартных условиях воздействия [134]. Одной из причин такой повышенной устойчивости является, по-видимому, увеличение электроноакцепторных свойств связи С-5—N-6 по сравнению со связью С-5—С-6 в урациле [135].

При облучении (254 *ммк*) 6-азаурацила в водном растворе был выделен с 50%-ным выходом 5-окси-5,6-дигидро-6-азаурацил [135, 136]:

Реакция протекает, вероятно, через возбужденное триплетное состояние [136, 326].

Значительное влияние на скорость фотореакции 6-азаурацила оказывают заместители при N-3 [136, 327]. При нагревании фотопродукта в кислой среде образуется [134] исходный 6-азаурацил с выходом 40%.

Значения рK_a замещенных 6-азаурацилов в возбужденном состоянии заметно ниже, чем в основном.

Тимин и его производные

Подобно урацилу в молекуле тимина, находящейся в возбужденном состоянии, наиболее реакционноспособным местом является двойная связь С-5—С-6. Это указывает на принципиальную возможность протекания фотохимических реакций, аналогичных реакциям урацила. Однако наличие метильной группы при С-5 существенно влияет на поведение тимина при облучении и на свойства его фотопродуктов.

Фотогидратация. В отличие от урацила тимин не образует устойчивого фотогидрата. Косвенные данные позволяют предполагать, что при УФ-облучении водного раствора тимина некоторое количество фотогидрата ($<5\%$) все же образуется, однако он весьма нестоек и после прекращения облучения регенерирует исходный тимин в течение 1—2 *мин* [137]. О способности тимина присоединять воду по двойной связи С-5—С-6 и нестабильности образующегося фотогидрата свидетельствуют также данные, полученные при изучении фотовосстановления тимидина [100] (см. стр. 662). Доводом в пользу этого служит, кроме того, образование N,N′-диметил-метилмалондиамида [138] при облучении 1,3-диметилтимина; реакция может, вероятно, протекать по схеме [100, 138]:

Замена метильной группы при С-5 на этильную изменяет фотохимические свойства соединения. Так, аналог тимидина —

5-этилдезоксиуридин при УФ-облучении (254 *ммк*) превращается в дезоксиуридин путем фотогидратации по связи С-5—С-6 и последующей элиминации молекулы этанола:

R — остаток дезоксирибозы

При более длинноволновом (265 *ммк*) облучении раствора 5-этилдезоксиуридина основной реакцией является фотодимеризация [328].

Фотодимеризация. Наиболее характерной для фотохимии тимина и его производных является реакция фотодимеризации. В разбавленных водных растворах (10^{-4} *М*) тимин практически устойчив к малым дозам облучения светом ближней ультрафиолетовой области (220—300 *ммк*). Квантовый выход [103, 139] его фотохимического изменения (λ 253,7 *ммк*) не превышает 10^{-4}. В отсутствие кислорода облучение при 265 *ммк* разбавленных водных растворов (10^{-4} *М*) тимина, тимидина и тимидин-5′-фосфата приводит к образованию с небольшим выходом соответствующих фотодимеров (табл. 12.8) [90]. Фотодимеризация 1,3-диметилтимина [329] в концентрированных (0,1 *М*) водных растворах протекает с относительно высоким квантовым выходом ($\sim 5 \cdot 10^{-2}$).

Таблица 12.8. **Фотодимеризация производных тимина в водном растворе при pH 4,4** [90]

Соединение	Доза при 265 *ммк*, *мкE/см*^{2}	Степень потери поглощения в области λ_{max}, %		Степень возврата поглощения в области λ_{max} после повторного облучения при 235 *ммк*, %	
		в азоте	в присутствии кислорода	в азоте	в присутствии кислорода
Тимин	30	10	6	9	1
Тимидин	12	12	3	9	0
Тимидин-5′-фосфат	11	11	2	6	0

Несколько легче фотодимеризация тимина протекает в ацетонитриле; начальный квантовый выход реакции [45] составляет $5 \cdot 10^{-3}$. Тиминовые фотодимеры с высоким выходом (40—90%) образуются

при УФ-облучении замороженных растворов тимина или его производных [98, 103, 111, 140, 141]. Квантовый выход димеров $1 < \varphi < 2$ (теоретически $\varphi_{max} = 2$, поскольку реагируют две молекулы соединения [142]). Несколько ниже процент димеризации при облучении производных тимина в сухих пленках (17—50% в зависимости от влажности) [98, 112, 143, 144]. Относительно легко звенья тимина димеризуются в составе олиго- и полинуклеотидов [145–147], а также в ДНК [148, 149]. Однако квантовый выход в этих случаях значительно ниже и составляет $3 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-2}$.

Структура фотодимеров. Фотодимер тимина обладает циклобутановой структурой [140, 141], для которой теоретически возможны четыре изомера XIXа — XIXг:

XIXа

XIXб

XIXв

XIXг

Все указанные изомеры были обнаружены в продуктах фотодимеризации тимина или его производных. Строение их подтверждено с помощью ИК- и ЯМР-спектров, химическим путем, а также

другими методами [100, 150–155, 330]. Исследована кристаллическая структура изомеров типа XIXг фотодимеров тимина и 1-метилтимина [331, 332]. Образование того или иного изомера обусловлено природой конкретного производного тимина и условиями фотодимеризации.

Димер XIXа является главным продуктом фотолиза тимина в замороженном растворе [144]. Аналогично димеры типа XIXа являются основными продуктами, образующимися при фотолизе водных растворов тимина [80], d(TpT) [156] и ДНК [153, 157] при температурах выше 0°С (ср. [333]). При облучении тимина, d(TpT) и ДНК в водном растворе образуются, кроме того, димеры типа XIXб [156, 158]. Фотолиз тимидина в замороженном растворе приводит к образованию изомеров всех четырех типов [153].

Кроме обычных димеров при УФ-облучении тимина в замороженном растворе [159, 334], d(TpT) в водном растворе [156] и ДНК в замороженном растворе [160, 161, 335] и в сухих пленках [162, 336] образуются фотопродукты, также, по-видимому, являющиеся димерами, но не обладающие циклобутановой структурой. Близкий по свойствам продукт был выделен при облучении ДНК бактериальных спор [162, 163]. Для нециклобутанового фотопродукта фотолиза тимина предложен ряд альтернативных структур [162, 164, 165]. На основании данных ЯМР-, ИК-, УФ- и масс-спектров в качестве наиболее вероятной рассматривается формула [159].

Иная структура была предложена [315] исходя из данных рентгенографических исследований:

Окончательное решение вопроса о структуре нециклобутанового фотодимера тимина в настоящее время остается открытым.

Помимо фотодимеров нециклобутанового и циклобутанового типов при облучении тимина в замороженном растворе обнаружен также фотопродукт, являющийся, по-видимому, тримером тимина [166, 334].

Свойства фотодимеров. В УФ-спектрах циклобутановых димеров тимина в нейтральной и кислой средах отсутствует максимум поглощения в области 260 *ммк* (рис. 12.11, см. также [337]).

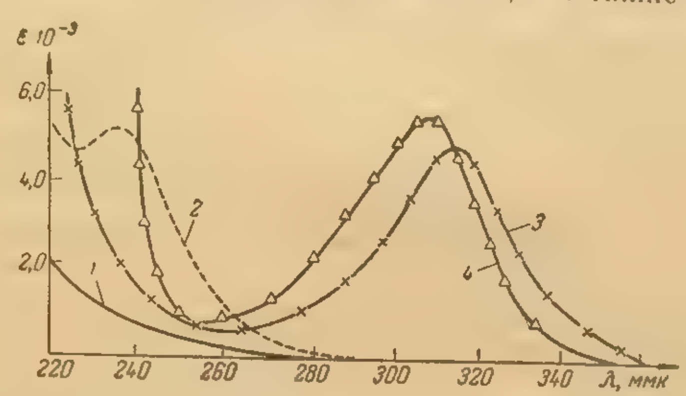


Рис. 12.11. УФ-Спектры циклобутановых фотодимеров тимина [103] и фотоаддукта [159] d ($\overline{TpT}$) [4]:

1 — спектр фотодимера тимина при pH 7; *2* — то же, в 0,1 н. растворе NaOH; *3* — спектр d ($\overline{TpT}$)[4] в нейтральной среде и при pH 2; *4* — то же, что *3*, но при pH 12.

Фотодимеры XIXа и XIXб устойчивы при кислых и щелочных pH; XIXв — относительно устойчив при $1 < pH < 6$; а XIXг — в интервале pH 1—3 [153, 337]. Гликозидная связь в фотодимерах производных тимина ослаблена [167] и может быть прогидролизована без расщепления димеров [153]. Титрование четырех изомерных димеров показывает, что в каждом из них имеются две ионизирующиеся группы с $pK_1 \sim 10{,}5$ и $pK_2 \sim 12{,}2$ (по-видимому, $>$ N-3—H).

Подобно фотодимерам урацила, тиминовые димеры фотолабильны. При облучении ($\lambda < 290$ *ммк*) водных растворов фотодимеров тимина и его производных они распадаются до исходных мономеров [103, 141, 168]. Чувствительность фотодимеров к облучению возрастает с уменьшением длины волны излучения [147]. Квантовый выход распада фотодимеров тимина и его производных до мономеров близок к единице (0,6—0,7) [98, 103, 145, 147, 337].

Фотодимеры, полученные при облучении ДНК, распадаются в присутствии фотореактивирующего фермента под действием видимого света [169, 170]. Есть данные, указывающие на то, что фотореактивирующий фермент из дрожжей разлагает только димеры типа XIXа, но не XIXб [158].

Фосфодиэфирная связь в фотодимерах динуклеотидов устойчива к действию фосфодиэстеразы змеиного яда [156]. При гидролизе этой фосфодиэстеразой УФ-облученной ДНК образуются олигонуклеотиды типа d(pNp$\overline{TpT}$)[148].

Аддукт тимина, полученный при УФ-облучении замороженного раствора, обладает максимумом поглощения в области 316 *ммк* (см. рис. 12.11). После кипячения в 0,5 н. соляной кислоте в течение 90 *мин* в УФ-спектре появляется второй максимум в области 256 *ммк*, что позволяет предполагать регенерацию двойной связи С-5—С-6 [159]. Полученный при облучении d(TpT) нециклобутановый фотопродукт d($\overline{TpT}$) [4] обладает аналогичным УФ-спектром (λ_{max} 325 *ммк*). При облучении в области максимума поглощения (313 *ммк*) он обратимо переходит в неидентифицированный фотопродукт d($\overline{TpT}$)[3]. Обратная реакция — переход d($\overline{TpT}$)[3] → d)$\overline{TpT}$)[4] — осуществляется при облучении в области 240 *ммк* [165].

Кинетика и механизм фотодимеризации. Тимин. Легкость димеризации его в замороженном водном растворе и высокий квантовый выход реакции объясняются агрегацией молекул тимина при замораживании и тем, что молекулы в этих агрегатах ориентированы относительно друг друга благоприятным для димеризации образом [98]. Образование агрегатов показано спектроскопически [98, 172]. Важность их появления для фотодимеризации подтверждается отсутствием димеров при УФ-облучении замороженных растворов тимина в глицерине [98, 171], где агрегаты не образуются. В ориентации молекул тимина большую роль играет, по-видимому, вода [98, 111, 142]. Это подтверждается рентгенографическими исследованиями моногидрата тимина [173]. Кроме того, УФ-облучение тимина в сухих пленках дает значительно меньший выход фотодимера (17%), чем в замороженном растворе; с увеличением влажности выход димера возрастает до 20—50% [144].

Таким образом, как и в случае производных урацила, благоприятными для димеризации факторами являются достаточно близкое расположение молекул тимина и соответствующая ориентация их относительно друг друга.

Приведенные факты объясняют низкий процент димеризации тимина в растворе и относительно бо́льшую легкость его димеризации в составе ди- и полинуклеотидов.

Динуклеозидфосфаты. УФ-облучение водного раствора тимидилил-(3→5)-тимидина приводит к образованию двух изомерных фотодимеров: d($\overline{TpT}$)[1] типа XIXа и d($\overline{TpT}$)[2] типа XIXб — в соотношении 5 : 1. Относительный выход изомеров не зависит от длины волны излучения. Однако суммарный выход димеров зависит от длины волны и составляет 2,5% при 225 *ммк* и 95% при 289 *ммк* (при оптимальных дозах облучения) [196]. Очевидно, как и для ури-

диновых олигомеров, при продолжительном облучении устанавливается равновесие между образованием и расщеплением фотодимеров. Равновесие сдвигается в сторону образования фотодимеров при увеличении длины волны и в сторону образования мономеров при ее уменьшении. Квантовый выход образования фотодимеров в водных растворах значительно меньше, чем в замороженных растворах, и составляет (оптимальные значения) $1 \cdot 10^{-2}$ для d($\overline{TpT}$)^1 и $0,25 \cdot 10^{-2}$ для d($\overline{TpT}$)^2. Величина его зависит от длины волны (рис. 12.12) [156]. Из зависимости поперечных сечений реакции от длины волны следует, что с максимальной скоростью фотодимеры образуются при облучении 260—270 *ммк*. Квантовый выход расщепления фотодимеров d(TpT) зависит от длины волны в гораздо большей степени, чем для димеров тимина [147] (см. рис. 12.12).

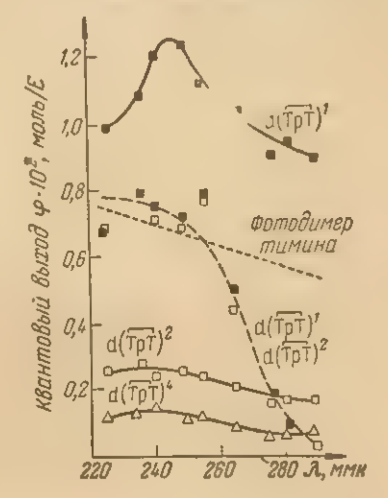


Рис. 12.12. Зависимость от длины волны квантовых выходов образования (сплошные кривые) и расщепления (пунктирные кривые) фотодимеров d(TpT) [156].

Кроме обычных фотодимеров при облучении d(TpT) образуется фотодимер, не обладающий циклобутановой структурой d($\overline{TpT}$)^4 (см. стр. 652). Количество этого фотодимера, его квантовый выход, скорость образования [156] сравнимы с аналогичными величинами для d($\overline{TpT}$)^2. Таким образом, превращение d(TpT) в водном растворе под действием УФ-облучения можно представить следующей общей схемой [156].

$$d(\overline{TpT})^1 \rightleftarrows d(TpT) \rightleftarrows d(\overline{TpT})^2$$

$$\downarrow$$

$$d(\overline{TpT})^4$$

$$\downarrow\uparrow$$

$$d(\overline{TpT})^3$$

Динуклеотид d(pTpT) образует димеры аналогично d(TpT) [145, 146]. Циклический динуклеотид $\underline{pTpT}$ полностью устойчив к УФ-облучению, очевидно, вследствие стерических препятствий для внутримолекулярной димеризации [146].

Полинуклеотиды. Как отмечалось выше, для фотодимеризации необходимы два условия — достаточно высокая местная концентрация тимина (самого или его производного) и благоприятствующая реакции ориентация тиминовых ядер относительно друг друга.

Первое условие, очевидно, выполняется в поли-dT и d(TpTp)-последовательностях в ДНК. Второе зависит от ряда факторов и прежде всего от конформации полинуклеотида и, следовательно, от температуры. УФ-Облучение политимидиловой кислоты в водном растворе при комнатной температуре приводит к фотодимеризации соседних нуклеозидных звеньев; закономерности этой димеризации аналогичны таковым для динуклеозидфосфатов, однако квантовый выход образования фотодимеров вдвое выше (0,02—0,03)[147, 338]. Начальная скорость низкотемпературной фотодимеризации поли-dT при 77° К приблизительно в 5 раз выше, чем при комнатной температуре (см. стр. 651). Однако конечное количество фотодимеров в 4 раза меньше[175], что, вероятно, объясняется малой долей тиминовых ядер, ориентированных благоприятно для димеризации при 77° К. При УФ-облучении замороженных растворов ДНК при 77° К только 0,65% тиминовых звеньев переходит в димерные фрагменты, а при комнатной температуре — уже около 20%[175]. При низкой температуре сшивки между цепями практически не образуются (см. ниже). Следует отметить, что понижение температуры влияет не только на степень фотодимеризации, но и на характер получающегося продукта. В этих условиях в ДНК из *E. coli* наряду с димерными фрагментами циклобутановой структуры образуются заметные количества тиминовых димерных фрагментов нециклобутанового типа[161] (см. также стр. 652).

Зависимость фотодимеризации тиминовых ядер от конформации ДНК подтверждается также тем фактом, что в пленках ДНК с относительной влажностью выше 65% образуются главным образом фотодимеры циклобутанового типа. При более низкой относительной влажности количество этих фотодимеров уменьшается и повышается выход фотопродуктов нециклобутанового типа (так называемых «споровых»). По-видимому, при уменьшении относительной влажности конформация ДНК в пленках изменяется[336].

Фотодимеризация тиминовых звеньев в одно- и двухцепочечных полинуклеотидах протекает с различной легкостью. В водных растворах при комнатной температуре денатурированная ДНК образует большее количество димерных фрагментов, чем нативная[176]. Димеризация тиминовых звеньев в поли-dT протекает с большей скоростью, чем в комплексе (поли-dA) · (поли-dT)[176]. Вместе с тем УФ-облучение денатурированной ДНК в водном растворе приводит к большему количеству димерных фрагментов, чем для той же ДНК в растворе этиленгликоля[176]. Очевидно, наличие двухцепо-

чечной структуры затрудняет образование димерных фрагментов при облучении, а межплоскостное взаимодействие облегчает фотодимеризацию [176, 338]. В пользу последнего предположения говорит тот факт, что в растворителях, уменьшающих межплоскостное взаимодействие, степень димеризации тиминовых ядер в d(TpT) [174] при УФ-облучении понижается.

В денатурированной ДНК количество образующихся при облучении димерных фрагментов линейно уменьшается при повышении температуры. Для нативной ДНК при температуре ниже T_m фотодимеризация не зависит от температуры; в области плавления количество димерных фрагментов резко падает [176] (рис. 12.13).

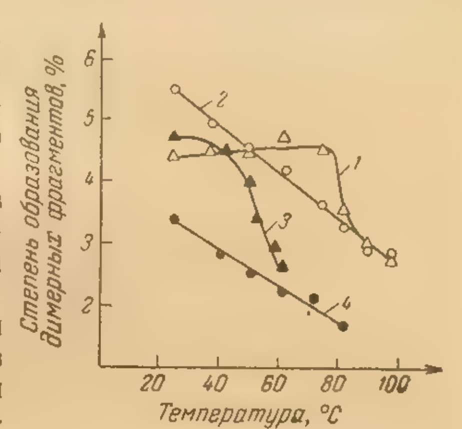


Рис. 12.13. УФ-Облучение (при 254 *ммк*) растворов ДНК из *Escherichia coli*. Зависимости степени образования димерных фрагментов от температуры [176]:

1 — нативная ДНК в воде; *2* — денатурированная ДНК в воде; *3* — нативная ДНК в смеси этиленгликоль — вода; *4* — денатурированная ДНК в смеси этиленгликоль — вода; доза 10^4 *эрг/мм²*. T_m ДНК в воде 79° С; T_m — в смеси этиленгликоль — вода 59° С.

Димеризация тиминовых звеньев в ДНК происходит главным образом между соседними основаниями одной цепи [2, 151]. Кроме тиминовых димерных фрагментов образуются также смешанные фотодимеры из звеньев тимина и цитозина [149]. При УФ-облучении ДНК и полинуклеотидов в виде сухих пленок [177, 178] и нативной ДНК в водном растворе отмечено, кроме того, образование сшивок между различными цепями [178а, 179а, 179б, 180]. В последнем случае зависимость относительного количества образовавшихся сшивок от длины волны применяемого излучения (спектр действия реакции) аналогична кривой УФ-поглощения тимина. Возможно, что причиной сшивок является димеризация тиминовых звеньев из разных цепей [179]. Температурная зависимость и ряд других факторов указывают на то, что для образования подобных сшивок необходимо локальное плавление двойной спирали [179а, 179б, 180], облегчающее, по-видимому, необходимую для димеризации ориентацию тиминовых ядер.

Возбужденные состояния, предшественники фотодимеров. Димеризация тимина в водном растворе ингибируется кислородом [90] (см. табл. 12.8), а в ацетонитриле полностью подавляется в присутствии изопрена [45]. Поскольку кислород и изопрен являются тушителями триплетного состояния, приведенные результаты свидетельствуют о том, что в этих условиях тимин может вступать в реакцию в возбужденном триплетном состоянии [181]. Доводом в

пользу того, что тимин в возбужденном триплетном состоянии способен димеризоваться, служит факт фотосенсибилизированной димеризации тимина в растворе [116, 155, 182, 184], когда заселение триплетного уровня тимина осуществляется за счет переноса энергии от возбужденного сенсибилизатора.

На основании изучения спектров флуоресценции предполагается, что в замороженном водном растворе димеризация идет через синглетное возбужденное состояние тимина [181, 185]. Фотодимеризация d(TpT) в растворе не подавляется кислородом и другими характерными тушителями триплетных состояний [90, 186]. Этот факт еще не может служить строгим доказательством синглетного возбужденного состояния как предшественника димера, поскольку из-за близкого расположения тиминовых ядер в d(TpT) скорость димеризации может превышать скорость тушения [93]. Однако спектры флуоресценции также свидетельствуют в пользу синглетного возбужденного состояния [188].

С помощью триплетной сенсибилизации ацетофеноном показано, что звенья тимина в ДНК могут димеризоваться при облучении через возбужденное триплетное состояние [187]. Однако это ни в коей мере не означает, что фотодимеризация не может идти при прямом возбуждении в синглетное состояние [188].

Таким образом, по-видимому, в зависимости от условий и от природы облучаемых соединений фотодимеризация тимина может идти как через возбужденное синглетное, так и через возбужденное триплетное состояние.

Фотодимеризация 1,3-диметилтимина в растворах также может протекать через состояния S_1 или T_1. Участие того или другого возбужденного состояния в образовании фотодимеров зависит, в частности, от природы растворителя [339]. В водных растворах фотодимеризация 1,3-диметилтимина идет, вероятно, главным образом через синглетное состояние; предполагается образование синглетных эксимеров [329, 340].

Окисление. Длительное УФ-облучение тимина в водном растворе приводит к окислению метильной группы при С-5 и к частичной деградации тиминового ядра. Среди фотопродуктов, полученных при облучении (254 *ммк*) водного раствора тимина (10^{-2} *M*, 16 *ч* при pH 6,1 и 37° С), были обнаружены 5-формилурацил XXI (R = R′ = H), урацил III (R = R′ = H), 5-оксиметилурацил XX (R = R′ = H) и неидентифицированный альдегид [189]. В аналогичных условиях, но после более длительного облучения (84 *ч*) 1,3-диметилтимин образует сложную смесь продуктов, среди которых были идентифицированы: аммиак, метиламин, 5-карбокси-1,3-диметилурацил XXII (R = R′ = CH_3), уксусная кислота, муравьиная кислота, формальдегид и 5-формил-1,3-диметилурацил XXI (R = R′ = CH_3) как главный продукт реакции [190]. По-видимому, фотоокисление тимина и его замещенного производного протекает

по следующей схеме [189, 190]:

XX XXI

XXII III

В качестве одного из возможных механизмов фотоокисления предложено промежуточное образование перекиси [191]

Иной тип фотоокисления тимина наблюдается при облучении его в насыщенных кислородом водных растворах дальним УФ-излучением (184,9 *ммк*), обладающим значительно более высокой энергией, чем обычно применяемое в фотобиологических исследованиях (250—270 *ммк*). При фотолизе тимина в таких условиях образуются гидроперекиси XXIII и XXIV (*цис*- и *транс*-изомеры), гликоль XXV, а также перекись водорода [139].

XXIII XXIV XXV

В разбавленных растворах при облучении УФ-светом (184,9 *ммк*) происходит главным образом фотолиз воды, а не тимина, и образование гидроперекиси XXIII (в результате атаки по двойной

связи С-5—С-6 ОН-радикалом [192, 193]) является вторичным фотопроцессом [139]:

$$H_2O \longrightarrow H\cdot + \cdot OH$$

XXVI

XXIII XXV

При повышении концентрации тимина практически все излучение поглощается тимином, т. е. происходит его прямой фотолиз. Образование одних и тех же продуктов в разбавленных и более концентрированных растворах свидетельствует о том, что реакция идет через то же промежуточное состояние XXVI. Это означает, что при прямом фотолизе тимина (184,9 *ммк*) последний, по-видимому, возбуждается в фотоионизованное состояние, которое характеризуется отрывом электрона (а не переходом его на более высокий энергетический уровень, как при обычном возбуждении) [139]. Возможен, однако, и другой механизм, объясняющий образование четырех изомерных гидроперекисей: реакция проходит через присоединение кислорода по двойной связи С-5—С-6 высшего возбужденного (нефотоионизованного) состояния тимина [139]:

или

Таким образом, и при облучении УФ-светом высокой энергии возбуждение локализуется на двойной связи С-5—С-6. Возбужде-

ние тимина при 184,9 *ммк* согласуется с его поглощением в далекой УФ-области [139].

Фотовосстановление. При УФ-облучении достаточно высокими дозами ($2 \cdot 10^6$ *эрг/мм*^{2}) тимина и ДНК в замороженном растворе или ДНК в водном растворе при комнатной температуре в продуктах реакции наряду с димером тимина был обнаружен 5,6-дигидротимин (или его звенья в составе ДНК) [194]. Количество дигидротиминовых звеньев, образовавшихся при облучении ДНК, мало зависит от температуры и при данных высоких дозах сравнимо с количеством димерных тиминовых фрагментов. По-видимому, дигидротиминовые звенья образуются в ДНК и при более низких дозах облучения, но квантовый выход их образования в этих условиях ниже, чем для образования димеров (ср. [3]).

Механизм образования звеньев дигидротимина, вероятно, радикальный. Показано, что при облучении ДНК в замороженном растворе образуются тиминовые свободные радикалы с неспаренным электроном при С-5. Образование радикалов происходит в результате присоединения водорода или дейтерия из растворителя к атому С-6 тимина, находящегося в возбужденном состоянии [195]. Возможно, что эти радикалы являются промежуточным продуктом при образовании остатков дигидротимина. Производные дигидротимина фотолабильны. При УФ-облучении водного раствора дигидротимидина наблюдается потеря ~80% поглощения при 230 *ммк* и в качестве главного продукта реакции образуется N-пропил-N-дезоксирибозилмочевина XXVII [100]:

XXVII

R—остаток дезоксирибозы

Фотовосстановление в присутствии боргидрида натрия. При облучении (253,7 *ммк* в водном растворе) в присутствии боргидрида натрия тимидин восстанавливается до дигидротимидина, который далее претерпевает восстановительное расщепление связи N-3—C-4 с образованием уреидоспирта XXVIII [196, 197]. Последняя стадия не зависит от облучения.

XXVIII

XXIX

R — остаток дезоксирибозы

Показано, что атом водорода (или дейтерия) из восстанавливающего агента присоединяется к атому C-5, а к C-6 присоединяется водород из растворителя. По-видимому, здесь, как и в отсутствие $NaBH_4$ (см. выше), промежуточными продуктами являются радикалы тимидина с неспаренным электроном при C-5. Кроме уреидоспирта XXVIII из продуктов реакции с выходом, близким к 30%, была выделена N-дезоксирибозилмочевина XXIX.

Образование XXIX свидетельствует в пользу того, что в указанных условиях вначале образуется фотогидрат тимидина, который, подобно дигидротимину, расщепляется под действием $NaBH_4$ [100].

$NaBH_4$

XXX

XXIX

R – остаток дезоксирибозы

Подтверждением предварительной фотогидратации тимидина служит образование в аналогичных условиях соответствующих производных мочевины типа XXX (выход ~50%) в случае фотогидратов уридина и цитидина [84].

6-Азатимин

Введение электроотрицательного атома азота в пиримидиновое ядро сильно сказывается на фотохимическом поведении соединений. 6-Азатимин значительно более устойчив к УФ-излучению, чем тимин. При облучении ($5{,}8 \cdot 10^3$ *эрг/мм*^{2}) замороженных растворов тимина и 6-азатимина в фотопродукты переходит 69% тимина и только 0,3% 6-азатимина. В присутствии тимина выход фотопродуктов 6-азатимина возрастает до 0,5%, а в присутствии цитозина — до 9%. Структура фотопродуктов в этих реакциях не исследована, однако, по-видимому, они не являются смешанными продуктами фотореакции 6-азатимина с тимином или с цитозином [198]. В присутствии азатимина выход фотопродуктов тимина и цитозина уменьшается [198].

Фотохимия звеньев 6-азатимина в составе ДНК не исследована. Однако известно, что бактерии, выращенные в присутствии 6-азатимина или 6-азаурацила, в 10—20 раз устойчивее нормальных к инактивирующему действию УФ-облучения (253,7 *ммк*) [199].

Цитозин и его производные

Распределение электронной плотности в цитозине, находящемся в возбужденном состоянии, как показывают результаты квантово-химических расчетов, отличается от распределения в урациле и тимине. В случае цитозина электронная плотность на атомах С-5 и С-6 увеличивается при возбуждении лишь незначительно, но сильно возрастает на атоме N-3, который даже в нейтральной молекуле является наиболее электроотрицательным атомом кольца (в противоположность атому С-5 для урацила и тимина). Результаты расчетов согласуются с экспериментальными данными, которые показывают, что фотохимические свойства цитозина и его производных во многом отличны от свойств производных урацила и тимина.

Наиболее характерной фотореакцией мономерных производных цитозина в водном растворе является гидратация. Однако в противоположность фотогидрату урацила фотогидраты производных цитозина крайне неустойчивы. В полимерной цепи цитозиновые ядра димеризуются под действием облучения, но эти димерные фрагменты отличны по свойствам от урацильных и тиминовых димерных фрагментов циклобутанового типа и образуются, по-видимому, по другому механизму.

Фотогидратация. При облучении в водных растворах цитозин, его замещенные, цитидин и цитидиловые кислоты XXXI присоединяют молекулу воды по двойной связи С-5—С-6 и образуют фото-

гидраты [200–203], являющиеся производными 6-окси-5,6-дигидроцитозина XXXII [84, 137, 204]:

$$\text{XXXI} \xrightarrow{H_2O\,(h\nu)} \text{XXXII}$$

XXXI: NH_2, N, N, O, R; XXXII: NH_2, N, HO, N, O, R

R — атом водорода, остаток рибозы или рибозофосфата

При облучении цитидин-3′-фосфата помимо фотогидрата образуется с малым выходом крайне нестойкий (время полураспада 9 *мин*) фотопродукт неизвестной структуры [205].

Квантовый выход фотогидратации [200, 202, 205] зависит от длины волны применяемого излучения и от pH (рис. 12.14). Кривые зависимости квантового выхода фотогидратации от pH аналогичны кривым титрования Cp, т. е. для протонированной формы цитидин-3′-фосфата вероятность образования фотогидрата при облучении в

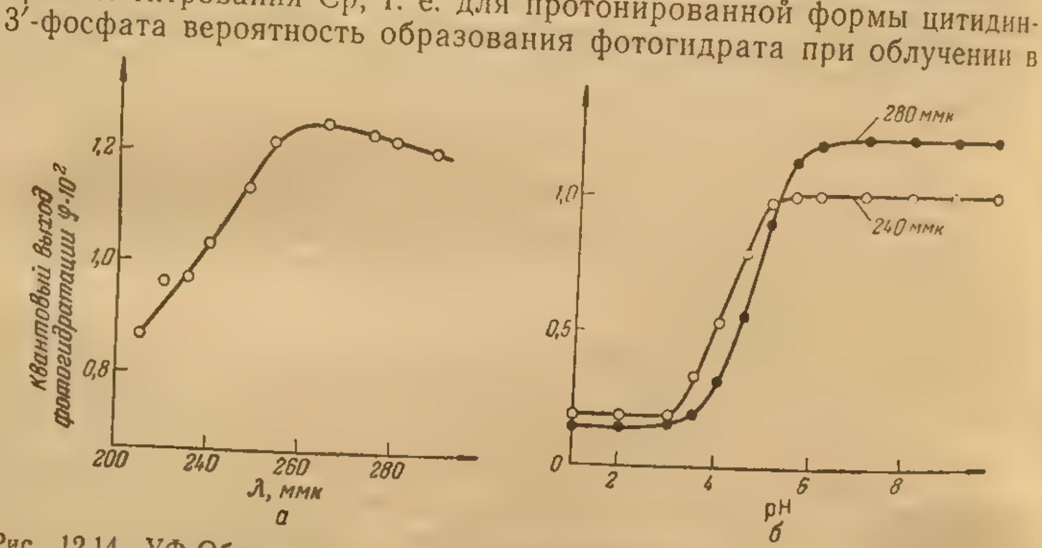


Рис. 12.14. УФ-Облучение цитидин-3′-фосфата. Зависимость квантового выхода фотогидратации от длины волны (*а*: pH раствора 6,5) и от pH среды (*б*) [205].

6—10 раз меньше, чем для нейтральной формы [205]. Поперечное сечение образования фотогидрата также является функцией длины волны и pH. Зависимость поперечного сечения от pH совпадает с аналогичной зависимостью для квантового выхода [205].

Из приведенных данных очевидно, что наибольшая вероятность образования фотогидратов и максимальная скорость процесса достигаются при облучении в области 260—270 *ммк* при pH ⩾ 5.

Под действием облучения фотогидраты образуются также звеньями цитозина, входящими в состав ди- [206, 208] и полинуклеотидов [206, 207, 209, 210, 341].

Свойства фотогидратов. Образование фотогидратов производных цитозина сопровождается уменьшением поглощения в области

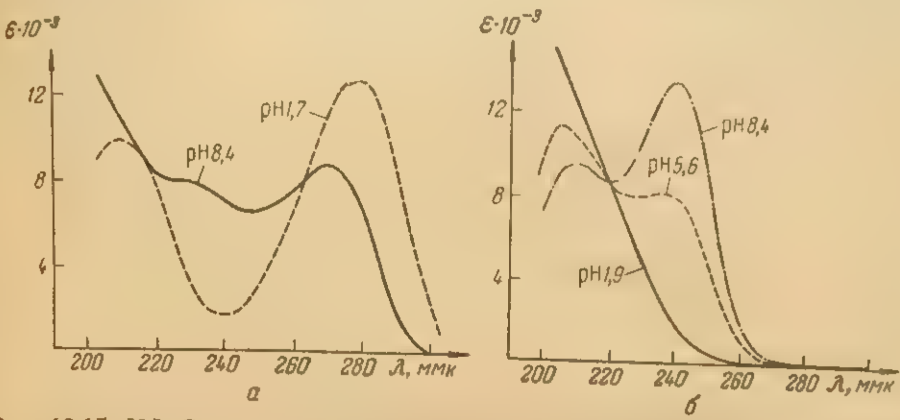


Рис. 12.15. УФ-Спектры цитидин-3′-фосфата (*а*) и его фотогидрата (*б*) при различных pH [211].

270 *ммк* и появлением максимума в области 240 *ммк*, что обусловлено насыщением двойной связи С-5—С-6 и наличием хромофора

$$O{=}\overset{2}{C}{-}\overset{3}{N}{=}\overset{4}{C}{-}$$

В кислой среде максимум при 240 *ммк* исчезает в результате протонирования по атому N-3 (рис. 12.15).

Подобно дигидроцитозиновым производным, фотогидраты цитозина и его замещенных имеют более высокое значение pK_a, чем соответствующее соединение с ненасыщенной двойной связью С-5—С-6 (например, для Cp величина pK_a составляет 4,26, а для $\overset{H_2O}{Cp}$ — соответственно 5,56).

В отличие от фотогидратов производных урацила [211] фотогидраты цитозиновых производных весьма нестойки. При выдерживании в нейтральных водных растворах они превращаются главным образом в исходные продукты [200, 202]; кроме того, наблюдается частичное дезаминирование [96, 211] с образованием фотогидратов урацильных производных:

XXXI ⟵ XXXII ⟶

R — атом водорода, остаток рибозы или рибозофосфата

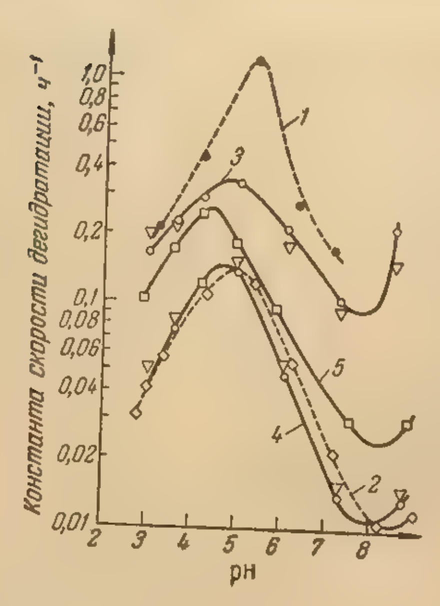


Рис. 12.16. Дегидратация фотогидратов производных цитозина при 0° С. Зависимость константы скорости реакции от pH [212]:

1 — $\overset{H_2O}{pC}$; 2 — $\overset{H_2O}{Cp}$; 3 — $Cp\overset{H_2O}{C}$; 4 — $\overset{H_2O}{Cp}C$; 5 — $\overset{H_2O}{Cp}\overset{H_2O}{C}$.

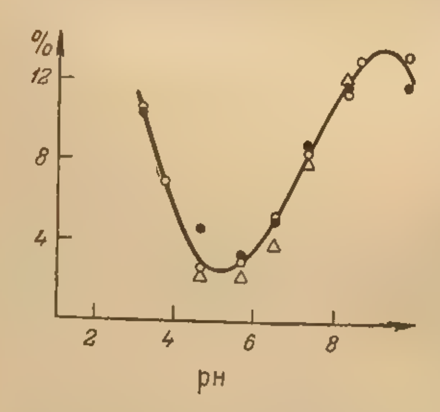


Рис. 12.17. Дезаминирование фотогидрата цитидин-3′-фосфата. Зависимость степени дезаминирования (в % $\overset{H_2O}{Up}$ от общего содержания фотогидрата) от pH [211]

(жирными кружочками показаны данные, полученные при 25° С, светлыми кружочками — при 15° С, треугольниками — при 6° С).

Скорость дегидратации зависит от pH и достигает максимального значения при pH 4,5—5. На кинетику дегидратации влияет также природа заместителей при N-1. Так, фотогидрат цитидин-5′-фосфата дегидратируется быстрее, чем фотогидрат цитидин-3′-фосфата; соответственно и динуклеозидмонофосфат. $Cp\overset{H_2O}{C}$ устойчивее, чем $\overset{H_2O}{Cp}C$ (рис. 12.16). Этерификация фосфатной группы цитидин-5′-фосфата значительно снижает скорость дегидратации при pH 6—7 [203].

Дезаминирование фотогидратов цитозиновых производных протекает медленнее, чем дегидратация. Например, период полупревращения фотогидрата цитидин-3′-фосфата при pH 7,5 и 37° С составляет 50 *мин*; за это время 45,5% фотогидрата дегидратируется до Cp и только 4,5% дезаминируется до фотогидрата уридин-3′-фосфата [211]. Скорость дезаминирования цитидин-3′-фосфата зависит от pH среды. В области максимальной скорости процесса дегидратации (pH 5) количество фотогидрата, подвергшегося дезаминированию, минимально (рис. 12.17).

Замещение цитозиновых производных по аминогруппе приводит к значительному увеличению стабильности соответствующих фотогидратов [203, 213]. Так, фотогидрат цитидина можно превратить в стабильное соединение, обработав его гидроксиламином или О-метилгидроксиламином [214]:

NH₂ … HO, N, O, R $\xrightarrow{H_2NOR'}$ HNOR′ … HO, N, O, R

XXIII

R — остаток рибозы; R′ = H или CH_3

Легкость дезаминирования фотогидрата цитозина обусловлена увеличением лабильности аминогруппы при С-4, происходящим при насыщении двойной связи С-5—С-6 в результате фотогидратации. Известно, что в производных дигидроцитозина аминогруппа значительно лабильнее, чем в производных цитозина. Она легче дезаминируется (см. стр. 339, 355; о механизме дезаминирования цитидина см. [215]) и легче замещается на остаток аминокислоты или амина [216].

Под действием боргидрида натрия фотогидрат цитидина претерпевает восстановительное расщепление и дезаминирование с образованием рибозилоксипропилмочевины XXXIV [84], что является одним из доказательств структуры фотогидрата.

XXXIV

Фотолиз замещенных цитозинов. Цитидин и цитидиловая кислота обратимо образуют фотогидрат при облучении как в воде, так и в буферных растворах. На фотохимическое поведение цитозина и его замещенных оказывают влияние неорганические ионы, в частности фосфатный и пирофосфатный. В присутствии этих ионов наряду с фотогидратом цитозина образуются частично другие фотопродукты, в настоящее время не идентифицированные [138, 217].

Замена карбонильной группы при С-2 цитозина на электронодонорную (метокси- или метил-) существенно меняет фотохимические свойства соединения. Влияние неорганических ионов в этом случае проявляется более ярко. При фотолизе подобных замещенных цитозинов в воде фотогидрат не является единственным

фотопродуктом [2, 217], а в фосфатном буфере он вовсе не образуется [217, 218]. В УФ-спектре продуктов фотолиза, полученных в фосфатном буфере, отсутствует максимум поглощения при 240 *ммк*, но появляется максимум в области 300 *ммк* [2, 217, 219]. При фотолизе 2-метокси-4-аминопиримидина в 0,05 *М* фосфатном буфере (pH 7,0) было выделено два основных продукта. На основании ряда свойств одному из них (λ_{max} = 300 *ммк*) приписана структура

```
O=C—N=C—C=CH
  |    |  |  |
CH₃O  H₂N H  OH
```

Второй продукт (λ_{max} = 275 *ммк*) является, по-видимому, замещенным пиримидином [218].

Распределение электронной плотности в пиримидиновом ядре существенно меняется с введением электронодонорного заместителя при С-5. Из сравнения фотохимических свойств урацила и тимина можно заключить, что метильная группа при С-5 повышает устойчивость пиримидинового ядра к УФ-облучению в водных растворах; кроме того, для производных тимина более характерна фотодимеризация, а не фотогидратация. Имеются данные о том, что метильная группа при С-5 стабилизует радикал XXXV

```
        O
 H₃C    ‖
   ·|\ /
     |   NH
     |   |
     \N/ \\O
      |
      H
```

XXXV

По-видимому, введение метильной группы по С-5 в ядро цитозина оказывает аналогичное влияние на фотохимическое поведение цитозиновых производных. 5-Метил- и 5-оксиметилцитидины, а также их нуклеотиды более устойчивы к действию УФ-излучения, чем сам цитидин (квантовый выход превращения их при фотолизе ~10^{-3}). Фотопродукты этих соединений при нагревании их растворов или при выдерживании в кислой среде не регенерируют исходные соединения, т. е., по-видимому, фотопродукты не являются фотогидратами. УФ-Спектры этих фотопродуктов свидетельствуют о сохранении пиримидинового цикла [220].

Фотолиз производных цитозина в спирте. При УФ-облучении в спиртовом растворе цитозин и ряд его алкильных замещенных образуют фотопродукт с максимумом поглощения в области 300 *ммк* [2, 221]. Цитидин, по-видимому, также вступает в аналогичную реакцию [222]. Структура данных фотопродуктов в настоящее

время не установлена, изучен лишь ряд их свойств. Продукты, получающиеся при фотолизе цитозина и 1-метилцитозина в спирте, при нагревании частично регенерируют исходные соединения [2, 221, 222]. Водный раствор фотопродукта цитозина чувствителен к облучению при 313 *ммк* [221].

При облучении 2,6-диметилцитозина в воде, этаноле и гексане образуются идентичные фотопродукты; вероятно, в данном случае растворитель не участвует в реакции [2]. Фотопродукт, полученный облучением 5-метилцитозина в спирте ($\lambda_{max}=310$ *ммк*), после растворения в воде спонтанно превращается в продукт фотолиза водного раствора 5-метилцитозина ($\lambda_{max} = 285$ *ммк*) [2].

При облучении цитозина в этаноле в реакцию, вероятно, вступает редкая таутомерная форма цитозина XXXVI

NH
N
N OH
H
XXXVI

имеющая [223] максимум поглощения в области 240 *ммк*. Это предполагают на основании УФ-спектров и спектров действия реакции (см. стр. 657).

Фотодимеризация. При УФ-облучении в водном растворе цитозин, цитидин и цитидиловые кислоты не димеризуются [2, 90]. При фотолизе замороженного раствора димер цитозина образуется с выходом 3—7%. Очевидно, фотодимеризация облегчает дезаминирование [3, 112], поскольку при оттаивании замороженных растворов димер цитозина легко превращается в димер урацила [3, 112]. В замороженных растворах цитозин образует также с небольшим выходом смешанные фотодимеры с урацилом и тимином [112]. Цитозиновые фотодимеры образуются, кроме того, наряду с фотогидратами при облучении растворов цитозиновых олиго- [207, 208, 224] и полинуклеотидов [209], а также растворов ДНК [149, 225] и РНК [226].

Свойства фотодимеров. Свойства цитозиновых фотодимеров изучены главным образом на примере продуктов, образуемых цитидил-(3'→5')-цитидином CpC. При облучении водного раствора CpC (фосфатный буфер, pH 7,2, 0° C) образуется фотодимер $\overline{CpC}^1$, который в результате темновой реакции обратимо превращается в фотодимер $\overline{CpC}^2$ с иной электрофоретической подвижностью. В водном растворе оба фотодимера частично дезаминируются, превращаясь в один и тот же уридиновый фотодимер $\overline{UpU}$. При облучении $\overline{CpC}^1$ и $\overline{CpC}^2$ превращаются в исходное соединение CpC [227].

Фотохимические превращения CpC в водном растворе могут быть представлены следующей общей схемой:

$$
\begin{array}{ccc}
 & CpC & \\
\overline{CpC}^2 & \rightleftarrows & \overline{CpC}^1 \\
 & \overline{UpU} &
\end{array}
$$

(CpC → $\overline{CpC}^1$; $\overline{CpC}^1$ → CpC; CpC ← $\overline{CpC}^2$; $\overline{CpC}^2$ ⇄ $\overline{CpC}^1$; $\overline{CpC}^2$ → $\overline{UpU}$; $\overline{CpC}^1$ → $\overline{UpU}$)

Вследствие высокой лабильности цитозиновых фотодимеров структура их до настоящего времени не установлена. Исчезновение максимума поглощения в области 270 *ммк* (рис. 12.18) указывает на нарушение сопряженной системы пиримидиновых ядер аналогично тому, как это происходит при насыщении двойной связи С-5—С-6 в процессе фотогидратации. Однако в спектре обоих фотодимеров ($\overline{CpC}^1$ и $\overline{CpC}^2$) отсутствует и характерный для фотогидратов максимум в области 240 *ммк*, что свидетельствует об исчезновении хромофора [228]

$$
O{=}\overset{2}{\underset{|}{C}}{-}\overset{3}{N}{=}\overset{4}{\underset{|}{C}}{-}
$$

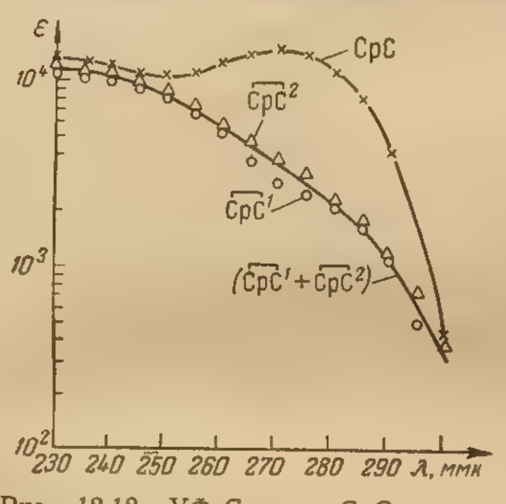


Рис. 12.18. УФ-Спектр CpC и его фотодимеров [228].

По-видимому, цитозиновые фотодимеры не являются обычными димерами циклобутанового типа, так как образование таких димеров предполагает сохранение указанного хромофора.

Для фотодимеров, образующихся при облучении CpC, предложено несколько вероятных структур [227] (по аналогии с фотодимеризацией других соединений — см., например, [229, 230]), однако окончательное решение этого вопроса требует дополнительных экспериментальных данных.

Следует отметить, что коэффициенты молярной экстинкции цитозиновых фотодимеров значительно выше, чем для тиминовых фотодимеров при всех длинах волн [228].

Выход фотодимеров при облучении водного раствора CpC зависит от ряда факторов *, и в частности от pH среды и длины волны

* Ввиду легкости дезаминирования для цитозиновых фотодимеров выход часто определяется по выходу продукта их превращения $\overline{UpU}$.

облучения. Нейтральная молекула динуклеозидмонофосфата образует фотодимер значительно легче, чем протонированная [208] (рис. 12.19). С увеличением длины волны облучения выход фотодимеров возрастает [208]. Скорость обратной реакции (расщепление фотодимеров при облучении) увеличивается с уменьшением длины волны в равной мере как для $\overline{\mathrm{CpC}}^1$, так и для $\overline{\mathrm{CpC}}^2$, однако квантовый выход обратной реакции не зависит от длины волны [228]. Скорость фоторасщепления цитозиновых фотодимеров значительно выше, чем аналогичных производных урацила и тимина. Это отчасти объясняется более высокими коэффициентами молярной экстинкции цитозиновых фотодимеров [228]. Кроме фоторасщепления лабильность фотодимеров CpC обусловлена также темновыми реакциями — взаимным превращением

$$\overline{\mathrm{CpC}}^1 \rightleftarrows \overline{\mathrm{CpC}}^2$$

и дезаминированием. Сравнение констант скоростей этих реакций при различных значениях pH показывает [227], что оба фотодимера наиболее устойчивы в области pH 6,8—8,4, причем $\overline{\mathrm{CpC}}^2$ несколько более устойчив, чем $\overline{\mathrm{CpC}}^1$. Дезаминирование, вероятно, не протекает одновременно по обоим звеньям оснований.

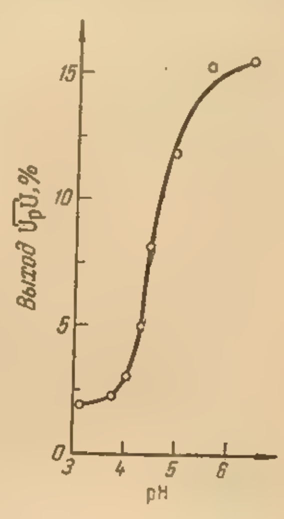


Рис. 12.19. Образование фотодимеров при облучении (280 *ммк*) CpC. Зависимость максимального выхода $\overline{\mathrm{UpU}}$ (в % от CpC) от pH (0,005 *М* фосфатный или формиатный буфер, 4° C) [208].

Скорость дезаминирования зависит от температуры. Так, время полупревращения при pH 7,0 и 0° C составляет 100 *ч*, а при 25° C соответственно 10 *ч*. Иными словами, при комнатной температуре за 24 *ч* $\overline{\mathrm{CpC}}$ полностью дезаминируется в $\overline{\mathrm{UpU}}$ [208].

Закономерности образования цитозиновых димерных фрагментов в полинуклеотидах аналогичны таковым для динуклеозидфосфатов.

При облучении ДНК наряду с уже отмечавшейся димеризацией тиминовых звеньев наблюдается фотодимеризация цитозиновых звеньев, а также образование димерных фрагментов смешанного типа (из цитозиновых и тиминовых ядер). Эффективность образования цитозиновых димерных фрагментов меньше, а скорость их расщепления при коротковолновом облучении больше, чем для тиминовых димерных фрагментов [208]. При низких дозах облучения ДНК содержание цитозиновых фотодимерных фрагментов сравнимо с количеством тиминовых димерных участков. При высоких

дозах доля тиминовых фрагментов возрастает [228] вследствие большей лабильности цитозиновых фотодимеров.

Соотношение процессов фотогидратации и фотодимеризации. Относительная эффективность образования фотогидратов и фотодимеров для производных цитозина в настоящее время изучена только на динуклеозидмонофосфате. Показано, что при облучении в интервале длин волн 230—290 *ммк* квантовый выход (рис. 12.20) и поперечное сечение фотодимеризации значительно выше, чем для фотогидратации. Таким образом, при этих длинах волн образование димеров является предпочтительным. По-видимому, именно в силу этого обстоятельства, а также вследствие нестабильности фотогидратов производных цитозина последние не были обнаружены при облучении нативной ДНК [231] и двухспиральных полинуклеотидных комплексов [206, 209]. Ряд данных свидетельствует о том, что при облучении одноцепочечных полинуклеотидов (денатурированная ДНК [149], РНК [232] и поли-С [206, 233]) фотогидраты цитозиновых производных образуются. Как недавно было показано, в нативной ДНК и двухцепочечных полинуклеотидных комплексах цитидиновые остатки образуют фотогидратные звенья, однако квантовый выход таких гидратных звеньев в 2—3 раза ниже, чем для одноцепочечных полинуклеотидов [341]. Межплоскостное взаимодействие также, повидимому, затрудняет образование фотогидратных цитидиновых звеньев, поскольку квантовый выход фотогидратации поли-С в 90%-ном этиленгликоле вдвое выше, чем в воде, и практически равен квантовому выходу гидратации рС в воде [341].

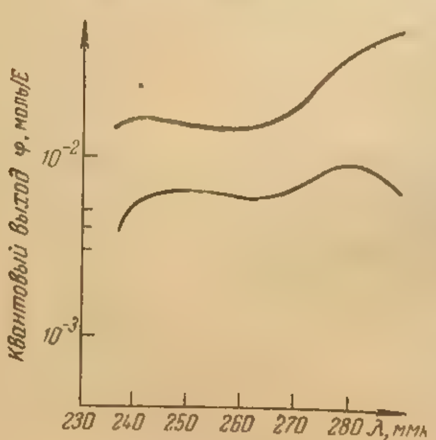


Рис. 12.20. Фотолиз СрС. Зависимость квантового выхода образования димера $\widehat{CpC}$ [1] (верхняя кривая) и фотогидрата (нижняя кривая) от длины волны [228].

Следует, однако, отметить, что предложенный метод [341] допускает и иную трактовку полученных результатов.

Отсутствие данных о зависимости образования цитозиновых фотогидратов и фотодимеров в полинуклеотидах от дозы облучения не позволяет пока более определенно судить об относительном содержании этих фотопродуктов в облученных полинуклеотидах.

2. Фотореакции пуриновых производных

Фотолиз в водных растворах. Отличительной чертой фотохимии пуринов и их производных является относительно бо́льшая по сравнению с пиримидиновыми производными устойчивость к УФ-облу-

чению[75, 234–236]. Пуриновые компоненты нуклеиновых кислот практически устойчивы к дозам, вызывающим фотогидратацию и фотодимеризацию пиримидиновых производных. При увеличении дозы УФ-излучения наблюдается снижение поглощения пуринов при λ_{max}, вплоть до его полного исчезновения[237–239]. Определенный на основании данных УФ-спектров квантовый выход фотохимического изменения водных растворов аденина и гуанина при облучении (253,7 *ммк*) на порядок ниже, чем для производных урацила, и составляет $0{,}6 \cdot 10^{-4}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ соответственно[2,97]. При переходе от оснований к нуклеозид-3′-фосфатам эти величины практически не изменяются ($0{,}5 \cdot 10^{-4}$ для Ap и $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ для Gp)[207]. Пуриновые олиго- и полинуклеотиды проявляют бо́льшую фотохимическую устойчивость, чем мононуклеотиды. Квантовый выход фотохимического изменения ApA и поли-A, определенный по изменению УФ-спектра, по крайней мере на порядок ниже, чем для Ap; для поли-G он составляет $0{,}5 \cdot 10^{-4}$[207].

Гликозидная связь в пуриновых нуклеозид-5′-трифосфатах лабильна в условиях УФ-облучения. Дозы, при которых аденозин-3′-фосфат, аденозин-5′-фосфат и аденозин практически не изменяются, приводят к заметному расщеплению аденозин-5′-трифосфата до аденина[2].

Устойчивость пуриновых производных к УФ-облучению зависит от характера и положения заместителей в гетероциклическом ядре[239, 240]. Наиболее устойчивы при облучении ($\lambda > 230$ *ммк*) аденин, аденозин и адениловые кислоты. Введение в пуриновое ядро карбонильной группы, особенно при C-2, повышает чувствительность соединения к УФ-облучению. Фотохимическая устойчивость пуриновых производных падает в ряду аденин > гипоксантин > > гуанин > ксантин > мочевая кислота[239, 240].

Для аденина и гипоксантина (заместители при C-6) скорость исчезновения поглощения в максимуме увеличивается в присутствии кислорода. Особенно ярко этот эффект проявляется в случае аденина: дозы, вызывающие полную деградацию аденина при УФ-облучении в присутствии кислорода, в атмосфере азота приводят к деструкции основания лишь на 10%[240]. Фотохимические изменения пуриновых производных с заместителями при C-2 и C-6 (гуанин, ксантин, мочевая кислота), напротив, ингибируются кислородом[240].

Продукты фотохимических превращений пуриновых производных в водном растворе мало исследованы. Из продуктов фотолиза аденина был выделен в небольших количествах гипоксантин, который, возможно, образуется в присутствии кислорода в результате окислительного отщепления аминогруппы. Однако гипоксантин образуется и при проведении реакции в азоте[240]. Можно предположить, что в возбужденном состоянии электрофильность атома C-6 аденина увеличивается, и в результате нуклеофильной атаки

гидроксил-анионами происходит замещение аминогруппы на гидроксильную.

При длительном УФ-облучении пуриновых производных, т. е. в условиях полного исчезновения поглощения при λ_{max}, в продуктах фотолиза были обнаружены аммиак и мочевина [239], что свидетельствует о расщеплении пуриновых ядер. Механизм этого расщепления пока не изучен. При длительном облучении мочевой кислоты XXXVII наряду с аммиаком и мочевиной в небольших количествах образуются триурет XXXVIII и циануровая кислота XXXIX; по-видимому, по следующей схеме [241]:

XXXVII

XXXVIII

XXXIX

8-Азааденин и 8-азагуанин значительно менее устойчивы к УФ-облучению, чем аденин и гуанин [134]; продукты фотопревращений азапроизводных не исследованы.

Фотолиз N-окисей пуриновых производных. В отличие от обычных замещенных пуринов N-окиси пуриновых производных проявляют высокую чувствительность к УФ-облучению в водном растворе. Квантовый выход фотохимического превращения N-окиси аденина составляет 0,1 [242], т. е. по сравнению с аденином N-окись аденина чувствительнее к УФ-свету более чем в 1000 раз. Следует отметить, что даже для большинства пиримидиновых производных квантовый выход фотохимического изменения значительно меньше.

Изучение фотохимических свойств N-окисей пуриновых производных проведено в основном на N-окисях аденина и аденозина [242–245]. Фотолиз водных растворов этих соединений сопровождается уменьшением интенсивности поглощения в максимуме (230 *ммк*) и небольшим увеличением абсорбции в области 290 *ммк*. Основными продуктами фотолиза N-окиси аденозина XL являются

изогуанозин (кротонозин) XLI, аденозин XLII и замещенный имидазолилрибозид XLIII [245].

NH₂ … N→O … R

XL

NH₂ … R XLII; NH₂ … R H XLI; OH⁻; N≡C, NH₂ … R H XLIII

R — остаток рибозы

Таким образом, фотореакция идет по трем направлениям: удаление окисного кислорода, перенос его к соседнему атому углерода и расщепление пиримидинового цикла по связи N-1—C-6. Возможно, что перенос кислорода к атому C-2 осуществляется через промежуточное производное XLIV [243]:

XL → [XLIV] → XLI

R-остаток рибозы

Относительные количества образующихся фотопродуктов зависят от условий облучения, в частности от pH среды. В воде при pH 6 относительные количества исходной N-окиси аденозина и фотопродуктов составляют: XL — 5%, XLI — 20%, XLII — 10%,

XLIII — 20%. В щелочной среде (pH 10) количество изогуанозина XLI увеличивается до 60%, поскольку XLIII в этих условиях способен циклизоваться до XLI. В кислой среде (0,01 н. H_2SO_4) фотолиз идет с меньшей интенсивностью и преимущественной реакцией является образование аденозина [245]; в результате получается: XL — 25%, XLI — 7%, XLII — 25%, XLIII — 5%.

Аналогично протекает фотолиз N-окиси аденина, из продуктов которого были выделены аденин, изогуанин и соединение, по ряду свойств аналогичное XLIII [242, 243, 245].

Сходным образом реагируют N-окиси и других 6-замещенных пуринов. N-Окись 6-метилпурина образует при облучении 2-окси-6-метилпурин и 6-метилпурин [243]. В случае 2,6-дизамещенных пуринов переноса окисного кислорода к С-2, по-видимому, не происходит: в продуктах облучения N-окиси изогуанина был обнаружен только изогуанин [243].

Предварительные данные свидетельствуют о том, что N-окись аденозина сохраняет высокую чувствительность к УФ-облучению и в составе полинуклеотидов. N-Окись поли-А легко подвергается фотолизу; при последующем щелочном гидролизе обнаружен фотопродукт с УФ-спектром, аналогичным спектру изогуанозина [245].

Присоединение спиртов. При облучении (253,7 *ммк*) раствора пурина в абсолютных дегазированных спиртах образуется ковалентная связь между α-углеродным атомом спирта и атомом С-6 пурина [246, 247].

$$\text{Пурин} + \text{RR'CHOH} \longrightarrow \text{6-(RR'C(OH))-1,6-дигидропурин}$$

R = R′ = H

R = CH_3; R′ = H

R = R′ = CH_3

Структура фотопродуктов подтверждена данными УФ-, ИК-ЯМР- и масс-спектров; при реакции в этаноле было выделено два изомера. Возникающие фотопродукты в спиртовом растворе весьма чувствительны к влаге и кислороду, в твердом виде они более стабильны [247].

Присоединение молекулы спирта сопровождается уменьшением поглощения при λ_{max} пурина (260 *ммк*) и появлением двух новых максимумов в областях 240 и 292 *ммк*. Квантовый выход этой реакции ~0,2 [246, 247]. В водном этаноле квантовый выход значительно

ниже, чем в абсолютном. В водном *трет*-бутаноле реакция не идет. Фотолиз спиртовых растворов пурина, насыщенных кислородом, приводит (судя по УФ-спектрам) к другим фотопродуктам, структура и свойства которых не исследованы [247].

Фотолиз 6-метилпурина в спирте протекает, по-видимому, аналогично фотолизу пурина, однако аденин, гипоксантин, ксантин и 6-этоксипурин устойчивы к облучению (253,7 *ммк*) в дегазированном этаноле [247].

VI. ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ РЕАКЦИИ

Фотохимические изменения в нуклеиновых кислотах и их компонентах могут быть результатом фотосенсибилизированных реакций (см. стр. 618), т. е. реакций, в которых не происходит непосредственного возбуждения оснований нуклеиновых кислот при облучении, а осуществляется передача энергии возбужденной молекулы-сенсибилизатора молекуле-акцептору (основание или действующий на него реагент). Передача энергии может проходить различными путями [9, 10, 248], например через образование метастабильного комплекса сенсибилизатора и акцептора или путем непосредственного переноса энергии. Важную роль в процессах сенсибилизации играет триплет-триплетный перенос энергии [249].

Димеризация пиримидинов

В определенных условиях пиримидиновые производные в возбужденном состоянии способны димеризоваться. Помимо димеризации, вызванной непосредственным возбуждением пиримидиновых соединений (облучение в области 260 *ммк*, см. стр. 638, 650, 669), известна также фотосенсибилизированная димеризация [118, 155, 182, 183, 187, 250].

В качестве сенсибилизаторов наиболее часто применяют кетоны — бензофенон, ацетофенон, пропиофенон, ацетон. Все эти вещества обладают заметным поглощением выше 310 *ммк* в отличие от пиримидинов, спектр поглощения которых расположен в более коротковолновой области. Под действием облучения в области 310—340 *ммк* урацил [116, 182, 250], тимин [116, 155, 182, 183] и оротовая кислота [116, 118] димеризуются в водных растворах в присутствии сенсибилизаторов. В результате реакции образуются фотодимеры, аналогичные полученным при прямом фотолизе. Цитозин в указанных условиях не димеризуется. Образования фотогидратов ни для одного из четырех соединений не наблюдается. При сенсибилизированном ацетофеноном фотолизе ДНК образуются димерные фрагменты из тиминовых звеньев [187, 342, 343] (изомеры типа XIXа, см. стр. 651), смешанные димерные фрагменты из тиминовых и цитозиновых звеньев и остатки 5,6-дигидротимина; относительные началь-

ные скорости образования этих продуктов составляют 1,00; 0,03 и 0,02 соответственно [342]. При сенсибилизированном фотолизе денатурированной ДНК степень фотодимеризации составляющих звеньев выше, чем при фотолизе нативной ДНК. В случае денатурированной ДНК помимо фотодимерных фрагментов типа XIXа отмечено [343] образование в малых количествах и продуктов типа XIXб.



Рис. 12.21. Схема уровней энергии и переноса энергии в реакции фотосенсибилизированной димеризации [116].

При фотолизе ДНК, сенсибилизированном ацетоном, возникают и цитозиновые димерные фрагменты [343] (сам цитозин не фотодимеризуется в присутствии ацетона [116]).

Следует отметить, что применение длинноволнового УФ-излучения при фотосенсибилизации практически исключает фотореверсию димеров до мономеров [116, 187], довольно значительную в случае прямого фотолиза (см. стр. 640, 653).

Известно, что перенос энергии от сенсибилизатора к акцептору возможен только в том случае, если энергия данного возбужденного состояния сенсибилизатора выше энергии возбужденного состояния акцептора. Для возбужденных состояний пиримидинов характерны относительно низкие триплетные и высокие синглетные уровни энергии. Сравнительная оценка энергии синглетных и триплетных возбужденных состояний исследуемых соединений и фотосенсибилизаторов, а также ряд других фактов показывает, что в случае фотосенсибилизированной димеризации возбуждение пиримидинов осуществляется за счет триплет-триплетного переноса энергии [58, 59, 116, 118, 184, 187]. Рис. 12.21 иллюстрирует относительное расположение уровней энергии сенсибилизатора и акцептора и процессы, протекающие после возбуждения сенсибилизатора.

Значения энергии триплетных уровней кетонных сенсибилизаторов и некоторых пиримидинов приведены в табл. 12.9.

Хотя величины энергий, полученные для твердых растворов при 77° К, не строго применимы для водных растворов при комнатной температуре, однако с их помощью можно получить достаточное представление о принципах подбора сенсибилизаторов, их специфичности и относительной эффективности. В частности, при сенсибилизированном ацетофеноном возбуждении ДНК [59] возбуждаются

только тиминовые звенья, так как для остальных оснований ДНК энергии триплетных возбужденных состояний выше, чем для ацетофенона (см., например, значение $E_{0,0}$ в табл. 12.9). Эффективность триплет-триплетного переноса тем выше, чем больше разность энергий триплетных состояний сенсибилизатора и акцептора.

Таблица 12.9. **Энергия триплетных уровней ряда сенсибилизаторов[116] и пиримидинов по данным спектров фосфоресценции при 77 °К**

(E_T — энергия триплетного состояния, соответствующая максимуму полосы фосфоресценции; $E_{0,0}$ — экстраполированная энергия перехода между нулевыми колебательными уровнями триплетного и основного состояний)

Соединение	E_T, $см^{-1}$	$E_{0,0}$, $см^{-1}$	Литература
Сенсибилизаторы:			
Бензофенон	24 400	24 800	*251*
Ацетофенон	26 000	26 500	*116*
Ацетон	—	28 200	*252*
Акцепторы:			
Цитозин	25 000	27 900	*59*
Урацил	24 400	27 500	*59*
Тимин	23 200	26 300	*116*
Оротовая кислота	—	21 300	*118*

Этим отчасти обусловлена зависимость квантового выхода фотосенсибилизированной димеризации от природы основания и сенсибилизатора (табл. 12.10). Кроме того, факторами, определяющими эффективность триплет-триплетного переноса энергии, являются поглощение сенсибилизатора в области длин волн применяемого излучения и эффективность интеркомбинационной конверсии в молекулах сенсибилизатора.

Таблица 12.10. **Фотосенсибилизированная димеризация пиримидинов с использованием разных сенсибилизаторов[116]**

Пиримидин	Длина волны применяемого облучения, *ммк*	φ 10^3, *моль/Е*		
		ацетон ($1\cdot10^{-3}$ *М*)	ацетофенон ($1\cdot10^{-3}$ *М*)	бензофенон ($5\cdot10^{-5}$ *М*)
Урацил	313	4,1	0,39	0,02
Тимин	313	4,2	1,6	11
Оротовая кислота	334	35	22	110

Примечание. Величины молярной экстинкции сенсибилизаторов при использованных длинах волн:

	при 313 *ммк*	при 334 *ммк*
Ацетон	0,35	0,02
Ацетофенон	105	27
Бензофенон	880	197

Расщепление фотодимеров

Димерные тиминовые фрагменты, образующиеся при УФ-облучении ДНК, расщепляются при их облучении видимым светом в присутствии фотореактивирующих ферментов. Изучению этого процесса посвящено большое количество работ (см., например, обзор [6]), однако механизм его до настоящего времени окончательно не выяснен.

С целью изучения систем, моделирующих действие фотореактивирующих ферментов, исследовалась возможность фоторасщепления пиримидиновых фотодимеров с помощью химических сенсибилизаторов. Было показано, что растворимые в воде натриевые соли трифенилен-2-сульфокислоты и нафталин-2,6-дисульфокислоты, а также нафтимидазолы XLV (R = H или CH_2OH)

XLV

сенсибилизируют расщепление тиминовых фотодимеров при облучении в области 313 *ммк* [253].

Интересно, что димер типа d(NpT͡pT), где N — рибозид нафтимидазола XLV (R = H), не расщепляется при облучении светом, поглощаемым этим нафтимидазолом [123]. Однако данное исследование проводилось в присутствии кислорода (тушитель триплетного состояния), что затрудняет трактовку результатов.

Механизм фотосенсибилизированного расщепления тиминовых фотодимеров не установлен. Для фотосенсибилизации с помощью сульфокислот показано участие в реакции триплетных состояний [253].

Фотодимеры 1,3-диметилурацила расщепляются при облучении в области длин волн, больших 290 *ммк*, в присутствии хлоранила [254]. Показано, что фотореактивирующий фермент из дрожжей расщепляет *цис-син-*, но не *транс-син-*фотодимерные тиминовые фрагменты в облученной денатурированной ДНК [158]. Сенсибилизация хлоранилом также оказалась избирательной: *транс-анти-*фотодимер 1,3-диметилурацила устойчив в условиях сенсибилизации, остальные стереоизомеры расщепляются с различной скоростью [254].

Имеются указания [123] на расщепление тиминовых фотодимеров при облучении их в водном растворе видимым светом в присутствии уранилацетата; наряду с тимином в этом случае были выделены продукты, строение которых не установлено.

VII. ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ

Фотодинамическим эффектом, или фотодинамическим действием, в химии нуклеиновых кислот называют сенсибилизированное красителями окисление оснований и их производных при облучении видимым светом в присутствии кислорода. Результатом фотодинамического действия является деструкция главным образом пуриновых оснований и нуклеозидов [255–258], приводящая в случае нуклеиновых кислот к потере биологической активности [259–262]. При более жестких условиях облучения иногда помимо пуриновых нуклеозидов частично деградируют также тимидин и уридин [256].

Сенсибилизаторы. Фотодинамической активностью обладают красители, относящиеся к различным классам. Наиболее изучено фотодинамическое действие метиленового синего XLVI [255, 256, 263, 267, 270], тиопиронина XLVII [261, 271, 273], акридинового оранжевого XLVIII [260, 264], профлавина XLIX [261, 274], а также рибофлавина L [258, 262, 268, 275, 276] и родственных ему люмифлавина LI [277, 278] и люмихрома LII [259, 265, 266]:

XLVI. X = S; Y = N; $R = R' = N(CH_3)_2$

XLVII. X = S; Y = CH; $R = R' = N(CH_3)_2$

XLVIII. X = NH; Y = CH; $R = R' = N(CH_3)_2$

XLIX. X = NH; Y = CH; $R = R' = NH_2$

L. $R = CH_2(CHOH)_3CH_2OH$

LI. $R = CH_3$

LII. R = H

Одним из факторов, обусловливающих фотодинамическую активность красителей, является, по-видимому, их способность образовывать комплексы с определенными гетероциклическими основаниями нуклеиновых кислот [260, 279], что характерно, например, для акридинов [280, 281, 341] и рибофлавина [282]. Определенную роль играет также, вероятно, способность красителей-сенсибилизаторов подвергаться фотовосстановлению [256, 283]. Однако общность этих положений строго не доказана, поскольку возможно, что механизм фотодинамического действия различных красителей не одинаков.

Фотодинамическое действие красителей в известной мере специфично. Например, в присутствии тиопиронина, метиленового синего и люмихрома происходит фотоокисление гуанозина и его производных [255, 256, 263, 264, 267, 271]. Рибофлавин сенсибилизирует фотоокисление главным образом аденозина [258, 268] и его производных [257, 276], а также гуанозина [258]. Возможно, что одной из причин такой специфичности является различие в способности красителей

к комплексообразованию с определенными гетероциклическими основаниями.

Факторы, влияющие на скорость фотодинамического окисления. Фотодинамический эффект наблюдается при облучении растворов, в которых концентрация красителя ниже концентрации окисляемого вещества и составляет 10^{-7}—10^{-4} *M* [256]. Кривая зависимости скорости реакции от концентрации красителя имеет колоколообразную форму, т. е. проходит через максимум. При окислении гуанозина в присутствии метиленового синего максимальная скорость реакции наблюдается при соотношении реагентов 1 : 41 [256]. Эффективность фотодинамического действия красителей различна, т. е. при одних и тех же концентрациях разных красителей скорость фотоокисления неодинакова. Количественное сопоставление фотодинамической активности в стандартных условиях было проведено лишь в немногих случаях. Так, показано, что метиленовый синий значительно эффективнее акридинового оранжевого при разрушении гуанозина [264]; при окислении звеньев гуанозина в составе полинуклеотида это различие в значительной степени сглаживается [264].

На основании данных по биологической инактивации ДНК [262, 273] (например, потере инфекционности) можно расположить красители по уменьшению фотодинамической активности в ряд: тиопиронин, рибофлавин > метиленовый синий > акридиновый оранжевый > > люмихром.

Скорость фотодинамического окисления зависит также от pH среды. Как видно из данных табл. 12.11, скорость фотоокисления увеличивается при переходе к pH, превышающим pK_a гетероциклического основания. По-видимому, анионные формы оснований реагируют быстрее нейтральных [256]. Не исключено, однако, что определенную роль здесь играет ионизация красителей, так как значения pK_a некоторых из них лежат в области pH ~ 9.

Относительная специфичность фотодинамического действия красителей, приводящая к окислительному разрушению определенных гетероциклических оснований, сохраняется при проведении реакции на уровне полинуклеотидов [255, 259–261, 270]. Однако скорость деградации звеньев гуанозина при облучении ДНК видимым светом в присутствии метиленового синего почти на порядок меньше, чем в случае мономерного нуклеозида [256].

При проведении реакции в мягких условиях (низкая концентрация красителя $\sim 10^{-7}$ *M*, непродолжительное время облучения) не наблюдается расщепления полинуклеотидной цепи или оно протекает лишь в незначительной степени [270]. В этих условиях, по-видимому, происходит частичное нарушение вторичной структуры двухцепочечных полинуклеотидов [256, 279]. В более жестких условиях, при повышении концентрации красителя, например, до 10^{-5} *M* и применении длительного облучения видимым светом, наблюдается деградация полинуклеотидной цепи [279]. Предполагается, что сначала

появляются одноцепочечные разрывы, а затем происходят разрывы двухцепочечного комплекса [285].

Таблица 12.11. **Деструкция пуриновых и пиримидиновых производных при облучении видимым светом в присутствии метиленового синего [256]**

Соединение	pK_a	Период полупревращения *, *мин*		
		при pH 6,8	при pH 8,8	при pH 10,5
Мочевая кислота	5,4; 10,3	1,2	0,4	0,3
Теофиллин	8,6	101	2,3	1,3
Ксантин	7,6	37	3,9	2,5
Ксантозин	5,8	15	4,5	5,7
Гуанин	9,2	(19)	10	3,1
Гуанозин	9,2	75	13	4,0
Тимин	9,8	(5)	41	6,3
Тимидин	9,8	(5)	(20)	9,6
Урацил	9,5	—	(17)	57
Гипоксантин	8,9	—	(12)	97
Пурин	8,9	—	(5)	(5)
6-Хлорпурин	—	—	(5)	(5)
Инозин	8,8	—	(5)	(5)
Аденозин	12,5	—	(5)	(5)

* В скобках приведена степень деструкции соединения (в %) за 120 *мин*.

Как отмечалось выше, реакции, вызванные фотодинамическим действием красителей, приводят, в частности, к биологической инактивации нуклеиновых кислот и полинуклеотидов, например к потере инфекционности вирусными РНК и ДНК [260, 261], трансформирующей активности ДНК [259, 274], акцепторной функции тРНК [262], а также к утрате способности расщепляться нуклеазами [270, 272].

Существенное уменьшение биологической активности в ряде случаев наступает на той стадии реакции, когда деградация полинуклеотидной цепи еще не обнаруживается. Например, облучение видимым светом РНК ВТМ в присутствии $8 \cdot 10^{-7}$ *М* акридинового оранжевого в течение 30 *мин* приводит к исчезновению 95% инфекционности, однако коэффициент седиментации РНК при этом практически не изменяется. Вероятно, потеря биологической активности в значительной мере связана с деструкцией гетероциклических оснований нуклеиновых кислот.

Продукты реакции. Среди продуктов окисления гуанозина, фотосенсибилизированного метиленовым синим или акридиновым оранжевым, идентифицированы гуанидин, рибозилмочевина, мочевина и рибоза. Рибоза также деградирует в данных условиях облучения. Отсутствие гуанина в продуктах реакции свидетельствует в пользу того, что расщепление N-гликозидной связи происходит только после частичного окисления пуринового ядра [263, 264]. Фотоокисление гуанина в присутствии люмихрома приводит к образова-

нию даже при низких дозах облучения углекислого газа, парабановой кислоты и гуанидина:

Использование гуанина, меченного в различных положениях ^{14}C, показало, что фотодинамическая деградация может идти, по-видимому, одновременно по нескольким направлениям с расщеплением пиримидинового и имидазольного циклов [259, 265, 266]. По-видимому, это справедливо и для других замещенных пуринов [267].

В продуктах фотосенсибилизированного окисления аденина идентифицирован в небольших количествах гипоксантин, лабильный в условиях облучения [268]. Возможно, что его образование путем окислительного дезаминирования является одной из первых стадий деструкции аденина.

Необходимо отметить, что при проведении фотодинамического окисления нуклеозидов, нуклеотидов или нуклеиновых кислот следует избегать применения трис-буфера, так как в условиях реакций образуются аддукты трис-(оксиметил)-аминометана с продуктами окислительной деструкции [269].

Влияние структурных и других факторов. Способность оснований, нуклеозидов и их производных к фотодинамическому окислению зависит от характера и положения заместителей в гетероциклическом ядре. Так, при облучении в присутствии метиленового синего расщепление пуринового ядра характерно для мочевой кислоты, ксантина, 2,6-диаминопурина и ряда других производных. 6-Меркаптопурин и 6-тиогуанозин чувствительны к фотодинамическому действию метиленового синего, однако их окисление, по-видимому, не сопровождается полной деградацией пуринового ядра, как можно судить по данным УФ-спектров [257, 267]. Полную устойчивость к фотодинамическому окислению обнаруживают 8-азапурины [257, 267]. В исследованных условиях аденин, гипоксантин и 2,6,8-трихлорпурин также устойчивы к фотодинамическому действию метиленового синего [257].

Механизм фотодинамического действия *. Красители, применяемые в качестве сенсибилизаторов, поглощают свет в видимой области, основания нуклеиновых кислот — в ультрафиолетовой области спектра. Таким образом, при облучении видимым светом могут возбуждаться лишь молекулы красителя. Ряд данных, в част-

* Подробное обсуждение механизмов фотопроцессов, сенсибилизированных красителями, см. [10, 277, 286, 287, 346, 347].

ности результаты, полученные с помощью импульсного фотолиза [278] и ингибирования реакции парамагнитными ионами [259], свидетельствуют о том, что краситель участвует в реакции в возбужденном триплетном состоянии [259, 277, 278, 287] (о характеристиках триплетных состояний красителей см. [345]).

Согласно имеющимся данным, наиболее вероятные механизмы фотодинамического эффекта сводятся к следующему: либо возбужденный краситель реагирует с кислородом и получающееся при этом соединение окисляет производное основания, либо осуществляется перенос энергии сенсибилизатора на кислород, который в возбужденном состоянии реагирует с производным основания [277, 287]. Прямой перенос энергии сенсибилизатора на производные основания невозможен, так как E_T красителя меньше E_T производного основания. Например, E_T люмифлавина [288] составляет 16 500 *см*$^{-1}$, а E_T гуанозина [58] 23 300 *см*$^{-1}$. Однако не может быть полностью исключен механизм переноса энергии на производное основания с высших возбужденных уровней триплетного состояния красителя, заселенных в результате двухфотонного процесса [289].

VIII. ДЕЙСТВИЕ ВИДИМОГО СВЕТА В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА

При облучении водных растворов оснований нуклеиновых кислот видимым светом в присутствии ионов двух- и трехвалентного железа в нейтральной или слабокислой среде гетероциклические основания полностью или частично расщепляются, о чем свидетельствуют изменения УФ-спектров растворов. Пиримидины расщепляются при этом быстрее пуринов [290]. В аналогичных условиях нуклеозиды и нуклеотиды наряду с частичной деградацией составляющих оснований претерпевают расщепление N-гликозидной связи с выделением свободного основания. При облучении полинуклеотидов наблюдаются те же процессы, сопровождающиеся, кроме того, частичным гидролизом фосфодиэфирных связей и потерей биологической активности [290].

Наличие или отсутствие кислорода практически не влияет на ход фотореакции с ионами трехвалентного железа. Перекись водорода ускоряет реакцию, особенно в присутствии ионов двухвалентного железа.

Механизм данной фотореакции не установлен; по-видимому, одной из стадий является процесс фотосенсибилизации.

IX. ФОТОРЕАКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ ВОЗБУЖДЕНИЕМ РЕАГЕНТА

Реакция с фурокумаринами. Фотореакция может быть индуцирована возбуждением одного из участвующих во взаимодействии компонентов. Выше рассматривались реакции, в которых в возбу-

жденном состоянии находится основание нуклеиновой кислоты или его производное. Известно, помимо того, несколько фотореакций компонентов нуклеиновых кислот, индуцированных возбуждением реагента. К их числу относятся реакции пиримидиновых производных с фурокумаринами — псораленом LIII и бергаптеном LIV, индуцируемые облучением (при 365 *ммк*, т. е. в области поглощения фурокумаринов)[291–296].

LIII ($R = R' = H$)

LIV ($R = OCH_3$, $R' = H$)

В отсутствие облучения фурокумарины образуют с ДНК нестойкие соединения, по-видимому, комплексной природы[291]. При облучении водных замороженных растворов фурокумаринов (псоралена или бергаптена) в присутствии по крайней мере 10-кратного избытка тимина или урацила были выделены продукты, содержащие два компонента. На основании их УФ-, ИК-, ЯМР-спектров и ряда других свойств этим компонентам была приписана структура аддуктов типа LV (присоединение по двойной связи С-4′—С-5′ фурокумарина) и типа LVI (присоединение по двойной связи С-3—С-4 фурокумарина)[293, 294]. В обоих случаях образуются по крайней мере по два изомера (*а* и *б*):

LVа

LVб

LVIа

LVIб

$R = H, CH_3$; $R' = H, OCH_3$

Аддукты обоих типов фотолабильны. При облучении в более коротковолновом, чем исходное излучение, диапазоне длин волн (250—315 *ммк*) они расщепляются до исходных соединений[293-296].

В случае облучения при 365 *ммк* в водных растворах при комнатной температуре присоединение идет преимущественно по связи С-3—С-4 фурокумарина с образованием продуктов типа LVI[293]. Продукты типа LV и LVI образуются также при реакции фурокумаринов в аналогичных условиях с урацильными и тиминовыми нуклеозидами, нуклеотидами и полинуклеотидами, а также с РНК и ДНК[293-296].

Показано, что фурокумарины при облучении реагируют также с цитидином и поли-С, однако структура возникающих при этом аддуктов не исследована. Предполагается, что с производными цитозина реакция идет по другому механизму[295].

Фурокумарины при облучении реагируют также с 6-азауридином, реакция протекает значительно медленнее, чем в рассмотренных выше случаях. Продукты ее не исследовались. 5-Бромдезоксиуридин реагирует с фурокумаринами, однако реакция протекает, по-видимому, иначе, чем с урацилом и тимином, как можно судить по УФ-спектрам[295].

Присоединение ароматических углеводородов. Полициклические ароматические углеводороды способны, хотя и не очень прочно, связываться с нуклеиновыми кислотами, по-видимому, за счет межплоскостного (гидрофобного) взаимодействия с ядрами гетероциклических оснований[297, 298]. Показано, что 3,4-бензпирен образует комплексы с ДНК[299]. При облучении в области $\lambda > 300 - 400$ *ммк* в водном нейтральном растворе 3,4-бензпирен[300] или, возможно, продукты его фотопревращения[301] ковалентно связываются с денатурированной ДНК. Наличие или отсутствие кислорода не влияет на ход этой реакции. ДНК в данных условиях, по-видимому, не деградирует, по крайней мере при непродолжительном облучении[300]. Место присоединения 3,4-бензпирена или его фотопродуктов к ДНК не установлено.

X. ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАТЕЛЕЙ НА ФОТОДИМЕРИЗАЦИЮ

Как уже упоминалось, ультрафиолетовое излучение приводит к изменению или потере биологической активности нуклеиновых кислот. Добавление в раствор нуклеиновой кислоты перед облучением небольших количеств (10^{-7}—10^{-5} *M*) акридинового оранжевого[302], профлавина[303, 304], атебрина, акрифлавина или акридина[305], образующих комплексы с нуклеиновыми кислотами, приводит к значительному снижению степени фотоинактивации. Установлено, что акридиновые красители ингибируют вызываемую ультрафиолетовым излучением фотодимеризацию пиримидиновых звеньев

в полинуклеотидной цепи [303, 306, 307]. Аналогичный эффект оказывает и ряд других соединений, образующих комплексы с ДНК (метиленовый зеленый, производные хинолина, фенантрена) [348, 349].

Добавление красителя после облучения не влияет на фотохимические повреждения, однако повторное облучение — уже в присутствии красителя — приводит к уменьшению количества ранее образовавшихся димерных фрагментов [303, 306]. Ряд данных указывает на то, что красители, ингибирующие фотодимеризацию, не влияют на расщепление фотодимеров и уменьшение количества последних при облучении вызвано сдвигом равновесия между мономерными звеньями оснований в полинуклеотидной цепи и их димерными фрагментами в сторону мономерных остатков из-за замедления димеризации [306].

В литературе обсуждаются два возможных механизма защитного действия красителей. Один из них предполагает ингибирование фотодимеризации вследствие стерических затруднений, вызванных интеркаляцией (внедрением) молекул красителя между основаниями полинуклеотида [304—306, 308]. Согласно второму механизму, защитное действие красителей обусловлено миграцией энергии возбуждения с оснований ДНК на комплексно-связанные с ними молекулы красителя (с последующим высвечиванием ее в виде флуоресценции или конверсией в тепловую энергию) [302, 305, 350]. В этом процессе основание служит сенсибилизатором, а краситель акцептором. Ряд данных свидетельствует о возможности такой миграции энергии [309, 310, 348, 350]. Миграционный механизм позволяет предполагать ингибирование не только фотодимеризации, но и других фотореакций производных оснований нуклеиновых кислот [365].

Ионы металлов (Cu^{2+}), образующие комплексы с основаниями ДНК, также влияют на выход фотодимерных фрагментов, повышая или понижая его в зависимости от структуры комплекса [351]. Возможно, что помимо изменения взаимного расположения оснований в таких комплексах подобный эффект отчасти объясняется изменением энергетических уровней оснований в составе комплекса [351].

ЛИТЕРАТУРА

1. Шугар Д., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Чаргаффа Э., Дэвидсона Дж., Издатинлит, 1962, стр. 34—37.
2. McLaren A. D., Shugar D., Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids, Pergamon Press, Oxford, 1964.
3. Ваккер А., в кн. «Нуклеиновые кислоты», под ред. Кона В., Дэвидсона Дж., Изд. «Мир», 1965, стр. 412—444.
4. Setlow J. K., in «Current Topic in Radiation Research», Ebert M., Howard A. (eds). North Holland Publishing Company, Amsterdam 1965
5. Smith K. C., Rad. Res., Suppl., 6, 54 (1966).
6. Setlow J. K., Rad. Res., Suppl., 6, 141 (1966).
7. Johns H. E., in «Radiation Research», Silini G (ed.), North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1967, p. 733.

8. Burr J. G., in «Advances in Photochemistry», Pitts J. N., Hammond G. W., Noyes A. A. jr. (eds), Interscience, N. Y., 1969, p. 193.
9. Турро Н., Молекулярная фотохимия, Изд. «Мир», 1967.
10. Калверт Дж., Питтс Дж., Фотохимия, Изд. «Мир», 1968.
11. Рид С., Возбужденные электронные состояния в химии и биологии, Издатинлит, 1960.
12. Brown I. H., Freeman K. B., Johns H. E., J. Mol. Biol., **15**, 640 (1966).
13. Beaven G. H., Holiday E. R., in «The Nucleic Acids», Chargraff E., Davidson J. N. (eds.), v. 1, Acad. Press, N. Y., 1955, p. 493—551.
14. Jordan D. O., The Chemistry of Nucleic Acids, London, 1960.
15. Data for Biochemical Research, Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. (eds), Oxford, 1962, p. 74.
16. Франк-Каменецкий М. Д., в кн. «Физические методы исследований белков и нуклеиновых кислот», под ред. Лазуркина Ю. С., Изд. «Наука», 1967, стр. 115.
17. Венкстерн Т. В., Баев А. А., Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, Изд. «Наука», 1967.
18. Methods in Enzymology, v. 3, Colowick S. P., Kaplan N. O. (eds), Acad. Press, N. Y., 1957, p. 720, 800.
19. Mason S. F., J. Chem. Soc., **1959**, 1240.
20. Rich A., Proc. Nat. Acad. Sci. US, **46**, 1044 (1960).
21. Krishnan V. G., Goodman L., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2042 (1961).
22. Clarck L. B., Tinoco I. jr., J. Am. Chem. Soc. **87**, 11 (1965).
23. Drobnik J., Augenstein L., Photochem. Photobiol., **5**, 13 (1966).
24. Drobnik J., Augenstein L., Photochem. Photobiol., **5**, 83 (1966).
25. Kleinwächter V., Drobnik J., Augenstein L., Photochem. Photobiol., **6**, 133 (1967).
26. Kleinwächter V., Drobnik J., Augenstein L., Photochem. Photobiol., **5**, 579 (1966).
27. Augenstein L., Studia Biophys., **3**, 9 (1967).
28. Fox J. J., Shugar D., Biochim. Biophys. Acta, **9**, 369 (1952).
29. Fox J. J., Cavalieri L. F., Chang N., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4315 (1953).
30. Shugar D., Wierzchowski K. L., Post. Biochem., Suppl. 4, 243 (1958).
31. Fox J. J., Shugar D., Biochim. Biophys. Acta, **9**, 199 (1952).
32. Batt R. D., Martin J. K., Ploeser J. M., Murray J., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3663 (1954).
33. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **7**, 309 (1960).
34. Shulman R. G., Rahn R. O., J. Chem. Phys., **45**, 2940 (1966).
35. Eisinger J., Photochem. Photobiol., **7**, 597 (1968).
36. Longworth J. W., Rahn R. O., Shulman R. G., J. Chem. Phys., **45**, 2930 (1966).
37. Skulachev V. P., Goldstein I. I., Roschupkin R. I., Biochim. Biophys. Acta, **129**, 645 (1966).
38. Гольдштейн И. И., Рощупкин Д. И., Скулачев В. П., Биохимия, **31**, 927 (1966).
39. Guéron M., Eisinger J., Shulman R. G., J. Chem. Phys., **47**, 4077 (1967).
40. Cohen B. J., Goodman L., J. Am. Chem Soc., **87**, 5487 (1965).
41. Hélène C., Santus R., Ptax M., C. r., C262, 1349 (1966).
42. Rahn R. O., Shulman R. G., Longworth J. W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **53**, 893 (1965).
43. Kasha M., El-Bayoumi M. A., Rhodes W., J. chim. phys., **58**, 916 (1961).
44. Guéron M., Shulman R. G., Ann. Rev. Biochem., **37**, 571 (1968).

45. Lamola A. A., Mittal J. P., Science, **154**, 1560 (1966).
46. Börrensen H. C., Acta Chem. Scand, **17**, 921 (1963).
47. Udenfried S., Zaltzman P., Anal. Biochem., **3**, 49 (1962).
48. Leng M., Pochon F., Michelson A. M., Biochim. Biophys. Acta, **169**, 338 (1968).
49. Weller A., Progr. Reaction Kinetics, **1**, 189 (1961).
50. Сухоруков Б. И., Полтев В. И., Блюменфельд Л. А., Биофизика, **9**, 266 (1964).
51. Данилов В. И., Биофизика, **12**, 540 (1967).
52. Pullman B., Pullman A., in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», v. 9, Davidson J. N., Cohn W. E. (eds), Acad. Press, N. Y. — L., 1969, p. 327.
53. Koudelka J., Augenstein L., Photochem. Photobiol., **7**, 613 (1968).
54. Eisinger J., Guéron M., Shulman R. G., Yamane T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **55**, 1015 (1966).
55. Guéron M., Shulman R. G., Eisinger J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **56**, 814 (1966).
56. Hélène C., Douzou P., Michelson A. M., Biochim. Biophys. Acta, **109**, 261 (1965).
57. Rahn R. O., Yamane T., Eisinger J., Longworth J. W., Schulman R. G., J. Chem. Phys., **45**, 2947 (1966).
58. Hélène C., Biochem. Biophys. Res. Comm., **22**, 237 (1966).
59. Lamola A. A., Guéron M., Yamane T., Eisinger J., Schulman R. G., J. Chem. Phys., **47**, 2210 (1967).
60. Pochon F., Leng M., Michelson A. M., Biochim. Biophys., Acta, **169**, 350 (1968).
61. Mantione M. J., Pullman B., Biochim. Biophys. Acta, **91**, 387 (1964).
62. Pullman B., Mantione M. J., Biochim. Biophys. Acta, **95**, 668 (1965).
63. Berthod H., Giessner-Prettre C., Pullman A., Int. J. Quant. Chem., **1**, 123 (1967).
64. Denis A., Pullman A., Theoret. chim. acta, **7**, 110 (1967).
65. Pullman B., Photochem. Photobiol., **7**, 525 (1968).
66. Данилов В. И., Шрамко О. В., Дядюша Г. Г., Биофизика, **12**, 544 (1967).
67. Дядюша Г. Г. Данилов В. И., Шрамко О. В., Мол. биол., **1**, 539 (1967).
68. Danilov V. I., Photochem. Photobiol., **6**, 233 (1967).
69. Danilov V. I., Kruglyak Y. A., Kyprievitch V. A., Ogloblin V. V., Theoret. chim. acta, **14**, 242 (1969).
70. Berthod H., Giessner-Prettre C., Pullman A., Theoret. chim. acta, **5**, 53 (1966).
71. Куприевич В. А., Данилов В. И., Шрамко О. В., Мол. биол., **1**, 343 (1967).
72. Данилов В. И., Куприевич В. А., Шрамко О. В., Биофизика, **12**, 186 (1967).
73. Данилов В. И., Куприевич В. А., Шрамко О. В., ДАН СССР, **177**, 1465 (1967).
74. Пюльман Б., в кн. Пюльмана Б., Пюльмана А. «Квантовая биохимия», Изд. «Мир», 1965, стр. 185.
75. Sinsheimer R. L., Hastings R., Science, **110**, 525 (1949).
76. Sinsheimer R. L., Rad. Res., **1**, 505 (1954).
77. Moore A. M., Thomson C. H., in «Progress in Radiobiology», v. 4, Mitchel J. S., Holmes B. E., Smith C. L. (eds.), Edinburg, 1956, p. 75.
78. Fikus M., Wierzchowski K. L., Shugar D., Photochem. Photobiol., **4**, 521 (1965).
79. Moore A. M., Canad. J. Chem., **37**, 1281 (1959).
80. Albert A., in «Heterocyclic Chemistry», London, 1959, p. 82.

81. Moore A. M., Canad. J. Chem., **35**, 163 (1957).
82. Moore A. M., Canad. J. Chem., **36**, 281 (1958).
83. Wechter W. J., Smith K. C., Biochemistry, **7**, 4064 (1968).
84. Miller N., Cerutti P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **59**, 34 (1968).
85. Chambers R. W., J. Am. Chem. Soc., **90**, 2192 (1968).
86. Gattner H., Fahr E., Ann., **670**, 84 (1963).
87. Moore A. M., Thomson C. H., Science, **122**, 594 (1955).
88. Wang S. Y., Apicella M., Stone B. R., J. Am. Chem. Soc., **78**, 4180 (1956).
89. Wang S. Y., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6196 (1958).
90. Greenstock C. L., Brown I. H., Hunt J. W., Johns H. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **27**, 431 (1967).
91. Burr J. G., Park E. H., Rad. Res., **31**, 547 (1967).
92. Burr J. G., Gordon B. R., Park E. H., Photochem. Photobiol., **8**, 73 (1968).
93. Brown I. H., Johns H. E., Photochem. Photobiol., **8**, 273 (1968).
94. Fikus M., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **13**, 40 (1966).
95. Logan D. M., Whitmore G. F., Photochem. Photobiol., **5**, 143 (1966).
96. Schuster H., Z. Naturforsch., **19b**, 815 (1964).
97. Shugar D., Wierzchowski K. L., Post. Biochem., Suppl., **4**, 243 (1958).
98. Wang S. Y., Nature, **190**, 690 (1961).
99. Cerutti P., Kondo Y., Landis W., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., **90**, 771 (1968).
100. Witkop B., Photochem. Photobiol., **7**, 813 (1968).
101. Smith K. C., Aplin R. T., Biochemistry, **5**, 2125 (1966).
102. Smith K. C., Meun D. H. C., Biochemistry, **7**, 1033 (1968).
103. Smietanowska A., Shugar D., Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II, **9**, 375 (1961).
104. Wacker A., Weinblum D., Träger L., Moustafa Z. H., J. Mol. Biol., **3**, 790 (1961).
105. Dönges K. H., Fahr E., Z. Naturforsch., **21b**, 87 (1966).
106. Fahr E., Fürst G., Dörhöfer G., Popp H., Angew. Chem., **79**, 235 (1967).
107. Zachau H. G., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **336**, 176 (1964).
108. Helleiner C. W., Pearson M. L., Johns H. E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **50**, 761 (1963).
109. Wierzchowski K. L., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **6**, 313 (1959).
110. Swenson P. A., Setlow R. B., Photochem. Photobiol., **2**, 419 (1963).
111. Wang S. Y., Fed. Proc., **24**, pt. 3, S—71 (1965).
112. Smith K. C., Photochem. Photobiol., **2**, 503 (1963).
113. Sztumpf E., Shugar D., Photochem. Photobiol., **4**, 719 (1965).
114. Beukers R., Ijlstra J., Berends W., Rec. trav. chim., **78**, 879 (1959).
115. Sztumpf-Kulikowska E., Shugar D., Boag J. W., Photochem. Photbiol., **6**, 41 (1967).
116. Greenstock C. L., Johns H. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **30**, 21 (1968).
117. Herbert M. A., Hunt J. W., Johns H. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **33**, 643 (1968).
118. Charlier M., Hélène C., Photochem. Photobiol., **6**, 501 (1967).
119. Pearson M. L., Johns H. E., J. Mol. Biol., **19**, 303 (1966).
120. Pearson M. L., Johns H. E., J. Mol. Biol., **20**, 215 (1966).
121. De Boer G., Pearson M., Johns H. E., J. Mol. Biol., **27**, 131 (1967).
122. Smith K. C., Photochem. Photobiol., **3**, 1 (1964).
123. Wacker A., Dellweg H., Träger L., Kornhauser A., Lodemann E., Türck G., Selzer R., Chandra P., Ishimoto M., Photochem. Photobiol., **3**, 369 (1964).

124. Hitchinson F., Koehnlein W., Rad. Res., **31**, 547 (1967).
125. Lion M. B., Biochim. Biophys. Acta, **155**, 505 (1968).
126. Berens K., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **10**, 25 (1963).
127. Ishihara H., Wang S. Y., Biochemistry, **5**, 2307 (1966).
128. Ishihara H., Wang S. Y., Biochemistry, **5**, 2302 (1966).
129. Rupp W. D., Prusoff W. H., Biochem. Biophys. Res. Comm., **18**, 145 (1965).
130. Rupp W. D., Prusoff W. H., Biochem. Biophys. Res. Comm., **18**, 158 (1965).
131. Danziger R. M., Hayon E., Langmuir M. E., J. Phys. Chem., **72**, 3842 (1968).
132. Wacker A., Dellweg H., Weinblum D., J. Mol. Biol., **3**, 787 (1961).
133. Rothman W., Kearns D. R., Photochem. Photobiol., **6**, 775 (1967).
134. Kittler L., Berg H., Photochem. Photobiol., **6**, 199 (1967).
135. Kittler L., Berg H., J. Electroanalyt. Chem., **16**, 251 (1968).
136. Kittler L., Löber G., Studia Biophys., **3**, 65 (1967).
137. Fahr E., Kleber R., Boebinger E., Z. Naturforsch., **21b**, 219 (1966).
138. Wang S. Y., Nature, **184**, Suppl. 4, 184 (1959).
139. Daniels M., Grimison A., Biochim. Biophys. Acta, **142**, 292 (1967).
140. Beukers R., Berends W., Biochim. Biophys. Acta, **41**, 550 (1960).
141. Beukers R., Berends W., Biochim. Biophys. Acta, **49**, 181 (1961).
142. Füchtbauer W., Mazur P., Photochem. Photobiol., **5**, 323 (1966).
143. Ishihara H., Photochem. Photobiol., **2**, 455 (1963).
144. Wang S. Y., Nature, **200**, 879 (1963).
145. Sztumpf E., Shugar D., Biochim. Biophys. Acta, **61**, 555 (1962).
146. Johns H. E., Rapaport S. A., Delbrück M., J. Mol. Biol., **4**, 104 (1962).
147. Deering R. A., Setlow R. B., Biochim. Biophys. Acta, **68**, 526 (1963).
148. Setlow R. B., Carrier W. L., Bollum F. J., Biochim. Biophys. Acta, **91**, 446 (1964).
149. Setlow R. B., Carrier W. L., J. Mol. Biol., **17**, 237 (1966).
150. Wulff D. L., Fraenkel G., Biochim. Biophys. Acta, **51**, 332 (1961).
151. Blackburn G. M., Davies R. J. H., Biochem. Biophys. Res., Comm., **22**, 704 (1966).
152. Blackburn G. M., Davies R. J. H., J. Chem. Soc., **1966**, 2239.
153. Weinheim D., Johns H. E., Biochim. Biophys. Acta, **114**, 450 (1966).
154. Weinblum D., Biochem. Biophys. Res. Comm., **27**, 384 (1967).
155. v. Wilucki I., Mátthäus H., Krauch C. H., Photochem. Photobiol., **6**, 497 (1967).
156. Johns H. E., Pearson M. L., Le Blanc J. C., Helleiner C. W., J. Mol. Biol., **9**, 503 (1964).
157. Blackburn G. M., Davies R. J., J. Am. Chem. Soc., **89**, 5941 (1967).
158. Ben-Hur E., Ben-Ishai R., Biochim. Biophys. Acta, **166**, 9 (1968).
159. Varghese A. J., Wang S. Y., Science, **160**, 186 (1968).
160. Varghese A. J., Wang S. Y., Science, **156**, 955 (1967).
161. Rahn R. O., Hosszu J. L., Photochem. Photobiol., **8**, 53 (1968).
162. Stafford R. S., Donnelan J. E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **59**, 822 (1968).
163. Smith K. C., Yoshikawa H., Photochem. Photobiol., **5**, 777 (1966).
164. Wang S. Y., Varghese A. J., Biochem. Biophys. Res. Comm., **29**, 543 (1967).
165. Pearson M. L., Ottensmeyer F. P., Johns H. E., Photochem. Photobiol., **4**, 739 (1965).
166. Wang S. Y., Varghese A. J., Biochem. Biophys. Res. Comm., **33**, 102 (1968).
167. Wacker A., Träger L., Z. Naturforsch., **18b**, 13 (1963).
168. Beukers R., Ijlstra J., Berends W., Rec. trav. chim., **78**, 883 (1959).

169. Setlow J. K., Boling M. E., Bollum F. J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1430 (1965).
170. Cook J. S., Photochem. Photobiol., 6, 97 (1967).
171. Wang S. Y., Photochem. Photobiol., 3, 395 (1964).
172. Davis S. L., Tinoco I., Nature, 210, 1286 (1966).
173. Gerdil R., Acta Cryst., 14, 333 (1961).
174. Wacker A., Lodemann E., Angew. Chem., 77, 133 (1965).
175. Rahn R. O., Hosszu J. L., Photochem. Photobiol., 7, 637 (1968).
176. Hosszu J. L., Rahn R. O., Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, 327 (1967).
177. Baranowska J., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 505 (1960).
178. Smith K. C., O'Leary M. E., Science, 155, 1024 (1967).
178a. Marmur J., Grossman L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 778 (1961).
179. Савич А. П., Завильгельский Г. Б., ДАН СССР, 162, 952 (1965).
179а. Завильгельский Г. Б., Борисова О. Ф., Минченкова Л. Е., Минят Э. Е., Биохимия, 29, 508 (1964).
179б. Завильгельский Г. Б., Минченкова Л. Е., Минят Э. Е., Савич А. П., Биохимия, 30, 652 (1965).
180. Glišin V. P., Doty P., Biochim. Biophys. Acta, 142, 314 (1967).
181. Eisinger J., Shulman R. G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 895 (1967).
182. Elad D., Krüger C., Smidt G. M. J., Photochem. Photobiol., 6, 495 (1967).
183. Ben-Hur E., Elad D., Ben-Ishai R., Biochim. Biophys. Acta, 149, 355 (1967).
184. Kornhauser A., Herac J. N., Trinaistic W., Chem. Comm., 1968, 1108.
185. Lamola A. A., Eisinger J., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 59, 46 (1968).
186. Eisinger J., Lamola A. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 558 (1967).
187. Lamola A. A., Yamane T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 443 (1967).
188. Lamola A. A., Photochem. Photobiol. 7, 619 (1968).
189. Alcántara R., Wang S. Y., Photochem. Photobiol., 4, 473 (1965).
190. Alcántara R., Wang S. Y., Photochem. Photobiol., 4, 465 (1965).
191. Wang S. Y., Alcántara R., Photochem. Photobiol., 4, 477 (1965).
192. Daniels M., Scholes G., Weiss J., Wheeler C. M., J. Chem. Soc., 1957, 226.
193. Ekert B., Monier R., Nature, 184, B. A. 58 (1959).
194. Yamane T., Wiluda B. J., Shulman R. G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 439 (1967).
195. Pershan P. S., Shulman R. G., Wiluda B. J., Eisinger J., Physics, 1, 163 (1964).
196. Ballé G., Cerutti P., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., 88, 3946 (1966).
197. Kondo Y., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., 90, 764 (1968).
198. Günter H. L., Prusoff W. H., Biochim. Biophys. Acta, 149, 361 (1967).
199. Günter H. L., Prusoff W. H., Biochim. Biophys. Acta, 142, 304 (1967).
200. Sinsheimer R. L., Rad. Res., 6, 121 (1957).
201. Wierzchowski K. L., Shugar D., Biochim. Biophys. Acta, 25, 355 (1957).
202. Wierzchowski K. L., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 8, 219 (1961).
203. Fikus M., Wierzchowski K. L., Shugar D., Photochem. Photobiol., 1, 325 (1962).
204. Kleber R., Fahr E., Boebinger E., Z. Naturwiss., 52, 513 (1965).
205. Becker H., Le Blanc J. C., Johns H. E., Photochem. Photobiol., 6, 733 (1967).
206. Wierzchowski K. L., Shugar D., Photochem. Photobiol., 1, 21 (1962).
207. Wierzchowski K. L., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 377 (1960).

208. Freeman K. B., Hariharan P. V., Johns H. E., J. Mol. Biol., 13, 833 (1965).
209. Setlow R. B., Carrier W. L., Bollum F. J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1111 (1965).
210. Small G. D., Tao M., Gordon M. P., J. Mol. Biol., 38, 75 (1968).
211. Johns H. E., Le Blanc J. C., Freeman K. B., J. Mol. Biol., 13, 849 (1965).
212. Hariharan P. V., Johns H. E., Photochem. Photobiol., 7, 239 (1968).
213. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 15, 261 (1968).
214. Small G. D., Gordon M. P., J. Mol. Biol., 34, 281 (1968).
215. Shapiro R., Klein R. S., Biochemistry, 6, 3576 (1967).
216. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 14, 293 (1967).
217. Moore A. M., Canad. J. Chem., 41, 1937 (1963).
218. Pitha P. M., Butler G. C., Canad. J. Biochem., 46, 893 (1968).
219. Moore A. M., Rad. Res., 16, 610 (1962).
220. Wierzchowski K. L., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 63 (1960).
221. Hélène C., Douzou P., C. r. 258, 196 (1964).
222. Hélène C., Haug A., Delbrück M., Douzou P., C. r., 259, 3385 (1964).
223. Hélène C., Rivial J. L., Pochon F., C. r., 264, 861 (1967).
224. Haug A., Photochem. Photobiol., 3, 207 (1964).
225. Dellweg H., Wacker A., Z. Naturforsch., 17b, 827 (1962).
226. Merriam V., Gordon M. P., Photochem. Photobiol., 6, 309 (1967).
227. Hariharan P. V., Johns H. E., Photochem. Photobiol., 8, 11 (1968).
228. Hariharan P. V., Johns H. E., Canad. J. Biochem., 48, 911 (1968).
229. Valentine D., Turro N. J., Hammond G. S., J. Am. Chem. Soc., 86, 5202 (1964).
230. Taylor E. C., Kan R. O., J. Am. Chem. Soc., 85, 776 (1963).
231. Setlow R. B., Carrier W. L., Photochem. Photobiol., 2, 49 (1963).
232. Tao M., Gordon M. P., Nester E. W., Biochemistry, 5, 4146 (1966).
233. Ono J., Wilson R. G., Grossman L., J. Mol. Biol., 11, 600 (1965).
234. Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., 72, 1835 (1950).
235. Errera M., Biochim. Biophys. Acta, 8, 30 (1952).
236. Cristensen E., Giese A. C., Arch. Biochem. Biophys., 51, 208 (1954).
237. Heyroth F. F., Loufbourow J. R., J. Am. Chem. Soc., 53, 3441 (1931).
238. Rapport D., Canzanelli A., Science, 112, 469 (1950).
239. Canzanelli A., Guild R., Rapport D., Am. J. Physiol., 167, 364 (1951).
240. Klaud M. J., Johnson L. A., J. Am. Chem. Soc., 79, 6187 (1957).
241. Fellig J., Science, 119, 129 (1954).
242. Levin G., Brown G. B., Fed. Proc., 21, 372 (1962).
243. Brown G. B., Levin G., Murphy S., Biochemistry, 3, 880 (1964).
244. Levin G., Setlow R. B., Brown G. B., Biochemistry, 3, 883 (1964).
245. Cramer F., Schlingloff G., Tetrahedron Letters, 1964, 3201.
246. Linschitz H., Connoly J. S., J. Am. Chem. Soc., 90, 2979 (1968).
247. Connoly J. S., Linschitz H., Photochem. Photobiol., 7, 791 (1968).
248. Rabek J. F., Photochem. Photobiol., 7, 5 (1968).
249. Теренин А. Н., Ермолаев В. Л., Изв. АН СССР, сер. физ., 1956, 471.
250. Krauch C. H., Krämer D. M., Chandra P., Milduer P., Feller H., Wacker A., Angew. Chem., 79, 944 (1967).
251. Kearns D. R., Case W. A., J. Am. Chem. Soc., 88, 5087 (1966).
252. Borkman R. F., Kearns D. R., J. Chem. Phys., 44, 945 (1966).
253. Lamola A. A., J. Am. Chem. Soc., 88, 813 (1966).
254. Rosenthal J., Elad D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 599 (1968).
255. Simon M. J., Van Vunakis H., J. Mol. Biol., 4, 488 (1962).
256. Simon M. J., Van Vunakis H., Arch. Biochem. Biophys., 105, 197 (1964).

257. Zenda K., Saneyoshi M., Chihara G., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 13, 1108 (1965).
258. Uehara K., Mizoguchi T., Okada Y., J. Biochem. (Japan), 55, 685 (1964).
259. Sussenbach J. S., Berends W., Biochim. Biophys. Acta, 76, 154 (1963).
260. Sastry K. S., Gordon M. P., Biochim. Biophys. Acta, 129, 32 (1966).
261. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, 5, 2446 (1966).
262. Tsugita A., Okada Y., Uehara K., Biochim. Biophys. Acta, 103, 360 (1965).
263. Waskell L. A., Sastry K. S., Gordon M. P., Biochim. Biophys. Acta, 129, 49 (1966).
264. Sastry K. S., Gordon M. P., Biochim. Biophys. Acta, 129, 42 (1966)
265. Sussenbach J. S., Berends W., Biochem. Biophys. Res. Comm., 16, 263 (1964).
266. Sussenbach J. S., Berends W., Biochim. Biophys. Acta, 95, 184 (1965).
267. Friedman P. A., Biochim. Biophys. Acta, 166, 1 (1968).
268. Uehara K., Mizoguchi T., Hosomi S., J. Biochem. (Japan), 59, 550 (1966).
269. Van Vunakis H., Seaman E., Kahan L., Kaplan J. W., Biochemistry, 5, 3986 (1966).
270. Simon M. I., Grossman L., Van Vunakis H., J. Mol. Biol., 12, 50 (1965).
271. Wacker A., Türck G., Gerstenberger A., Naturwiss., 50, 377 (1963).
272. Dellweg H., Werner O., Biophysik, 3, 241 (1966).
273. Wacker A., Chandra P., Studia Biophys., 3, 239 (1967).
274. Bellin J. S., Oster G., Biochim. Biophys. Acta, 42, 533 (1960).
275. Uehara K., Mizoguchi T., Okada Y., Umemoto J., J. Biochem. (Japan), 59, 556 (1966).
276. Uehara K., Mizoguchi T., Okada Y., Kuwashima J., J. Biochem. (Japan), 59, 443 (1966).
277. Knowles A., Studia Biophys., 3, 97 (1967).
278. Knowles A., Roe E. M. F., Photochem. Photobiol., 7, 421 (1968).
279. Freifelder D., Davidson P. F., Geiduschek E. R., Biophys. J., 1, 389 (1961).
280. Galley W. C., Biopolymers, 6, 1279 (1968).
281. Kubota J., Miura M., Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 2989 (1967).
282. Roth J. A., Mc Cormick D. B., Photochem. Photobiol., 6, 657 (1967).
283. Oster G., Bellin J. S., Kimball R. W., Schrader M. E., J. Am. Chem. Soc., 81, 5095 (1959).
284. Bellin J. S., Grossman L. J., Photochem. Photobiol., 4, 45 (1965).
285. Bellin J. S., Yankus C. A., Biochim. Biophys. Acta, 112, 363 (1966).
286. Теренин А. Н., Фотоника молекул красителей, Изд. «Наука», 1967.
287. Livingston R., Studia Biophys., 3, 1 (1967).
288. Lhoste J. M., Haug A., Hemmerich P., Biochemistry, 5, 3290 (1966).
289. Hélène C., Studia Biophys., 3, 43 (1967).
290. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Biochemistry, 4, 226 (1965).
291. Musajo L., Rodighiero G., Breccia A., Dall'Aqua F., Malesani G., Photochem. Photobiol., 5, 739 (1966).
292. Musajo L., Rodighiero G., Breccia A., Dall'Aqua Z., Malesani G., Experientia, 22, 75 (1966).
293 Musajo L., Bordin F., Bevilaqua R., Photochem. Photobiol., 6, 927 (1967).
294. Musajo L., Bordin F., Caporale G., Marciani S., Rigati G., Photochem. Photobiol., 6, 711 (1967).

295. Krauch C. H., Krämer D. M., Wacker A., Photochem. Photobiol., 6, 341 (1967).
296. Krauch C. H., Strahlentherapie, 136, 250 (1968).
297. Ts'o P. O. P., Lu P., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 51, 17 (1964).
298. Brookes P., Lawley P. D., Nature, 202, 781 (1964).
299. Ball J. K., McCarter J. A., Smith M. F., Biochim. Biophys. Acta, 103, 275 (1965).
300. Ts'o P. O. P., Lu P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51, 272 (1964).
301. Reske G., Stauff J., Z. Naturforsch., 20b, 15 (1965).
302. Завильгельский Г. Б., Ильяшенко Б. Н., Минят Э. Е., Рудченко О. Н., ДАН СССР, 155, 937 (1964).
303. Beukers R., Photochem. Photobiol., 4, 935 (1965).
304. Setlow J. K., Setlow R. B., Nature, 213, 907 (1967).
305. Завильгельский Г. Б., Рудченко О. Н., Данилейченко В. В., Биофизика, 14, 34 (1969).
306. Setlow R. B., Carrier W. L., Nature, 213, 906 (1967).
307. Klimek M., Vlašinová M., Studia Biophys., 3, 249 (1967).
308. Setlow R. B., Science, 153, 379 (1966).
309. Well G., Calvin M., Biopolymers, 1, 401 (1963).
310. Владимиров Ю. А., Гаглоев В. Н., в сб. «Молекулярная биофизика», под ред. Франка Г. М., Изд. «Наука», 1965, стр. 149.
311. Michelson A. M., Pochon F., Biochim. Biophys. Acta, 174, 604 (1969).
312. Whillans D. W., Herbert M. A., Hunt J. W., Johns H. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 912 (1969).
313. Pietrzykowska I., Shugar D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 225 (1969).
314. Evans N. A., Savige W. E., McLaren A. D., Photochem. Photobiol., 9, 515 (1969).
315. Kondo Y., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., 91, 5264 (1969).
316. Smith K. C., Biochem. Biophys. Res. Comm., 34, 354 (1969).
317. Goddard V., Streeter D., Weber C., Gordon M. P., Photochem. Photobiol., 5, 213 (1966).
318. Werbin H., Valentine R. C., Hidalgo-Salvatierra O., McLaren A. D., Photochem. Photobiol., 7, 253 (1968).
319. Khattak M. N., Wang S. Y., Science, 163, 1341 (1969).
320. Whillans D. W., Johns H. E., Photochem. Photobiol., 9, 323 (1969)
321. Pleiss M., Ochiai H., Cerutti P. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 34, 70 (1969).
322. Favre A., Yaniv M., Michelson A. M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 266 (1969).
323. Lis A. W., Allen F. W., Biochim. Biophys. Acta., 49, 190 (1961).
324. Tomasz M., Chambers R. W., J. Am. Chem. Soc., 86, 4216 (1964).
325. Tomasz M., Chambers R. W., Biochemistry, 5, 773 (1966).
326. Kittler L., Löber G., Studia Biophys., 6, 41 (1968).
327. Kittler L., Löber G., Photochem. Photobiol., 10, 35 (1969).
328. Pietrzykowska I., Shugar D., Science, 161, 1248 (1968).
329. Morrison H., Feely A., Kleopfer R., Chem. Comm., 1968, 358.
330. Hollis D. P., Wang S. Y., J. Org. Chem., 32, 1620 (1967).
331. Camerman N., Nyburg S. C., Weinblum D., Tetrahedrom Letters, 1967, 4127.
332. Einstein J. R., Hosszu J. L., Longworth J. W., Rahn R. O., Wei C. H., Chem. Comm., 1967, 1063.
333. Longworth J. W., Proc. Nat. Acad. Sci. US, 59, 829 (1968).
334. Rahn R. O., Hosszu J. L., Photochem. Photobiol., 10, 131 (1969).
335. Rahn R. O., Setlow J. K., Hosszu J. L., Biophys. J., 9, 510 (1969).
336. Rahn R. O., Hosszu J. L., Biochim. Biophys. Acta, 190, 126 (1969).

337. Herbert M. A., LeBlanc J. C., Weinblum D., Johns H. E., Photochem., Photobiol., 9, 33 (1969).
338. Tramer Z., Wierzchowski K. L., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 16, 83 (1969).
339. Morrison H., Kleopfer R., J. Am. Chem. Soc., 90, 5037 (1968).
340. Lisewski R., Wierzchowski K. L., Chem. Comm., 1969, 348.
341. Grossman L., Rodgers E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 975 (1968).
342. Lamola A. A., Photochem. Photobiol., 9, 291 (1969).
343. Ben-Ishai R., Ben-Hur E., Hornfeld Y., Israel J. Chem., 6, 769 (1968).
344. Blake A., Peacocke A. R., Biopolymers, 6, 1225 (1968).
345. Chambers R. W., Kearns D. R., Photochem. Photobiol., 10, 215 (1969).
346. Kearns D. R., Khan A. U., Photochem. Photobiol., 10, 193 (1969).
347. Grossweiner L. J., Photochem. Photobiol., 10, 183 (1969).
348. Sutherland J. C., Sutherland B. M., Biochim. Biophys. Acta, 190, 545 (1969).
349. Sutherland B. M., Sutherland J. C., Biophys. J., 9, 1045 (1969).
350. Sutherland B. M., Sutherland J. C., Biophys. J., 9, 292 (1969).
351. Sutherland B. M., Sutherland J. C., Biophys. J., 9, 1329 (1969).
352. Small G. D., Tao M., Gordon M. P., J. Mol. Biol., 38, 75 (1968).
353. Setlow R. B., Progr. Nucl. Acid Res., 8, 257 (1968).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Николай Константинович К о ч е т к о в, Эдуард Израилевич Б у д о в с к и й, Евгений Давидович С в е р д л о в, Наталия Андреевна С и м у к о в а, Михаил Флорианович Т у р ч и н с к и й, Владимир Николаевич Ш и б а е в

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Издательство „Химия", М., 1970 г.

720 с. УДК 547.963.32 : 577.155.2

Редактор О. И. С л у ц к и й
Технический редактор В. В. К о г а н
Художник К. М. Е г о р о в
Корректоры С. А. Г у б е н к о, Г. Е. П о т а п о в а

Т12256. Подписано к печати 7/VIII 1970 г. Формат бумаги $60 \times 90^{1}/_{16}$. Печ. л. 45. Уч.-изд. л. 50,64. Тираж 6000 экз. Типограф. бум. № 2. Цена 3 р. 24 к. Тем. план 1970 г., № 23. Зак. № 614.

Ордена Трудового Красного Знамени
Ленинградская типография № 2 имени Евгении Соколовой Главполиграфпрома
Комитета по печати при Совете Министров СССР, Измайловский проспект, 29.

A(2')p
аденозин-2'-фосфат

Ap
аденозин-3'-фосфат

A>p, A(2',3')>p
аденозин-2',3'-циклофосфат

A(3',5')>p
аденозин-3',5'-циклофосфат

pU
уридин-5'-фосфат

pA
аденозин-5'-фосфат

pU
уридин-5'-фосфат

Ap
...ин-3'-фосфат

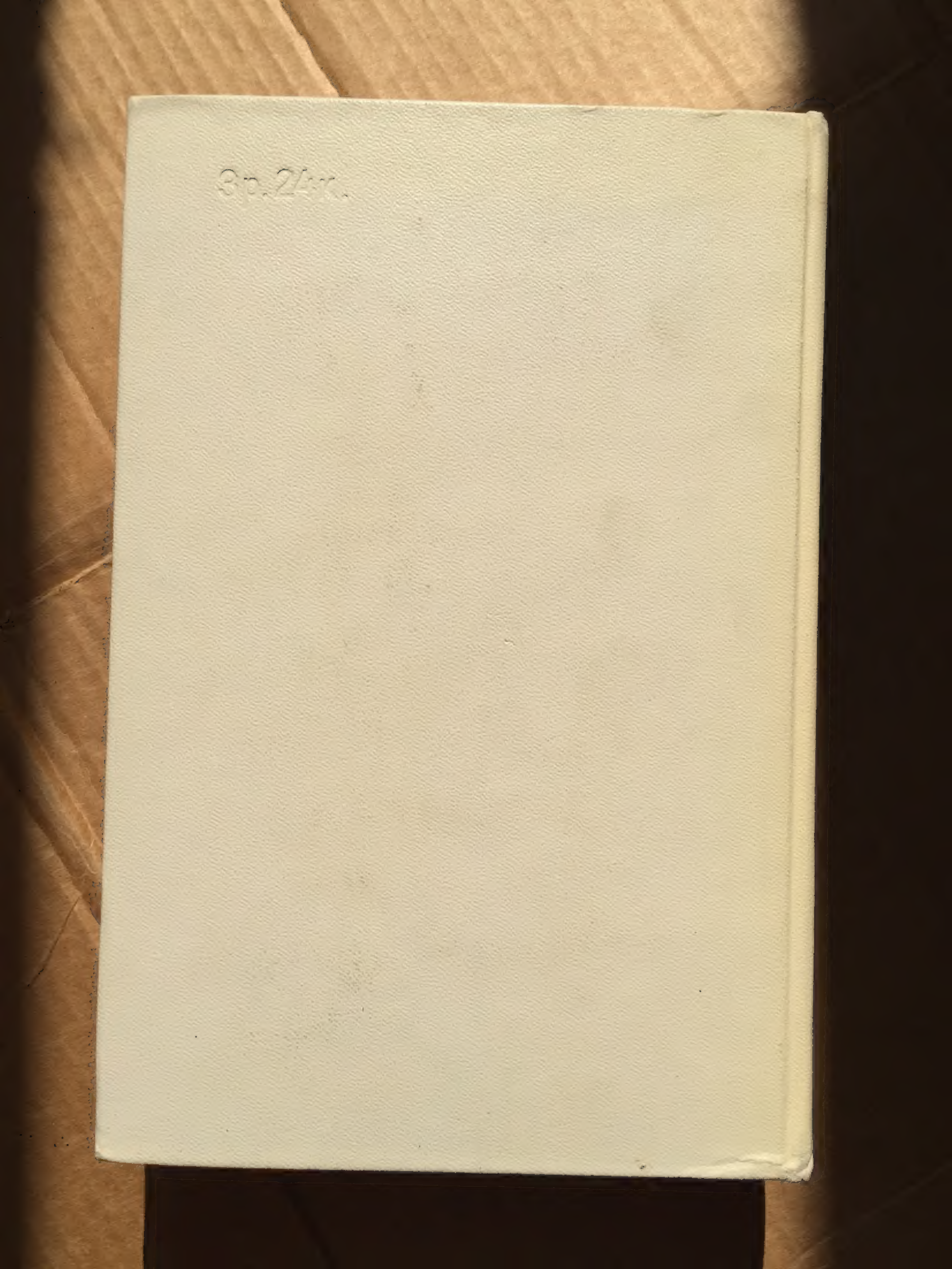
...(5')>p
...'-циклофосфат

pA
аденозин-5'-фосфат

pdAp
дезоксиаденозин-3',5'-дифосфат

ppA
аденозин-5'-дифосфат

pppdA
дезоксиаденозин-5'-трифосфат


3р. 24к.

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ